

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología



TESIS DOCTORAL

**La enzima amidohidrolasa de ácidos grasos como diana terapéutica en
modelos de neuroinflamación aguda y crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Vázquez Fernández

Directores

**Julián Romero Paredes
Rosa María Tolón Rafael**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**LA ENZIMA AMIDOHIDROLASA DE ÁCIDOS
GRASOS COMO DIANA TERAPÉUTICA EN
MODELOS DE NEUROINFLAMACIÓN AGUDA Y
CRÓNICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carmen Vázquez Fernández

Bajo la dirección de los doctores

Julián Romero Paredes
Rosa María Tolón Rafael

MADRID, 2016

DR. JULIÁN ROMERO PAREDES, investigador principal del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid.

DRA. ROSA MARÍA TOLÓN RAFAEL, investigadora del Laboratorio de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “La enzima amidohidrolasa de ácidos grasos como diana terapéutica en modelos de neuroinflamación aguda y crónica” presentada por Carmen Vázquez Fernández, licenciada en Biotecnología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado.

VºBº

VºBº

Dr. Julián Romero Paredes

Dra. Rosa María Tolón Rafael

A mis padres.

ABREVIATURAS

Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonilglicerol
AA	Ácido araquidónico
Aβ	β -amiloide
AC	Adenilato ciclasa
aCFS	Líquido cefalorraquídeo artificial (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AEA	Anandamida o N-araquidonil etanolamida
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora de β -amiloide (<i>β-amyloid precursor protein</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BACE	β -secretasa (<i>beta-site APP cleaving enzyme</i>)
BCA	Ensayo de proteínas del ácido bicinconínico (<i>bicinchoninic acid assay</i>)
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CB1	Receptor cannabinoide tipo I
CB2	Receptor cannabinoide tipo II
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CDK-5	Proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (<i>cyclin-dependent kinase 5</i>)
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DMS-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EPM	Laberinto en cruz elevado (<i>Elevated plus maze</i>)
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos (<i>fatty acid amide hydrolase</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFA	Ácido flufenámico (<i>flufenamic acid</i>)
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acid protein</i>)

GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3 (<i>glycogen synthase kinase 3</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>horseradish peroxidase</i>)
IL-1β	Interleuquina tipo 1 β
IL-4	Interleuquina tipo 4
IL-6	Interleuquina tipo 6
IL-10	Interleuquina tipo 10
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
I.P	Intraperitoneal
IP₃	Inositol trifosfato
KPBS	PBS-potásico
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAP	Proteínas asociadas a los microtúbulos (<i>microtubule associated proteins</i>)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
MWM	Laberinto de agua (<i>Morris water maze</i>)
NADA	N-araquidonoildopamina
NAEs	N-aciletanolaminas
NAPE	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina
NAT	N-acetiltransferasa
NFT	Ovillos neurofibrilares (<i>neurofibrillary tangles</i>)
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
OEA	N-oleiletanolamina
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina
PEA	N-palmitoil etanolamina
PFA	Paraformaldehído
PI	Fosfoinosítidos
PIP₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PPAR_s	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PS1	Presenilina 1

PS2	Presenilina 2
PVDF	Polivinilidenofluoruro
ROI	Región de interés (<i>region of interest</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	Sistema endocannabinoide
SEM	Error estándar de la media (standard error of the mean)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TBE	Tris-borato con EDTA
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor)
TLR	Receptores tipo toll (<i>toll-like receptors</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor)
TRPV1	Potencial transitorio del receptor vanilloide 1 (<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>)
WT	<i>Wildtype</i>

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	13
1. CANNABINOIDES	14
1.2. Sistema endocannabinoide	16
1.2.1. Receptores cannabinoides	16
1.2.1.1. Receptor CB ₁	17
1.2.1.2. Receptor CB ₂	19
1.2.2. Mecanismos de transducción de señales mediados por los receptores cannabinoides	20
1.2.2.1. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB ₁	20
1.2.2.2. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB ₂	21
1.2.3. Otros posibles receptores de cannabinoides	22
1.2.4. Ligandos cannabinoides	23
1.2.4.1. Anandamida	24
1.2.4.2. 2-araquidonilglicerol	25
1.2.5. Antagonistas	25
1.2.6. Síntesis y degradación de los endocannabinoides	26
1.2.6.1. Síntesis y degradación de AEA	28
1.2.6.2. Síntesis y degradación del 2-AG	29
1.2.7. Papel fisiológico del SEC	30
2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	31
2.1. Aspectos generales	31
2.2. Características clínicas	33
2.2.1. Sintomatología	33
2.2.2. Neuropatología	34
2.3. Principales proteínas implicadas en el desarrollo de la EA	36
2.3.1. Proteína tau	36
2.3.2. Proteína Precursora Amiloide (APP)	37
2.3.2.1. Procesamiento de la APP	38

2.3.2.2. Formas oligoméricas de A β	40
2.3.2.3. Angiopatía amiloide	40
2.3.2.4. Hipótesis cascada amiloide	40
2.4. Neuroinflamación en la patogénesis de la EA	42
2.4.1. Microglía	43
2.4.2. Astrocitos	47
2.4.3. Mediadores inflamatorios	50
2.4.3.1. Citoquinas	50
2.4.3.2. Quimioquinas	51
2.4.3.3. Óxido Nítrico	51
2.4.3.4. Especies reactivas de oxígeno	51
2.4.3.5. Ciclooxygenasa	52
2.5. Factores de riesgo	52
2.5.1. Edad	52
2.5.2. Sexo	53
2.5.3. Educación	53
2.5.4. Hipertensión	53
2.5.5. Diabetes	53
2.5.6. Factores genéticos	54
2.6. Diagnóstico	55
2.7. Tratamientos actuales	56
3. EL SEC COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LA NEUROINFLAMACIÓN	57
3.1. Efecto antiinflamatorio	58
3.2. Efecto antioxidante	58
3.3. Efecto antiglutamatérgico	59
3.4. Neurogénesis	59
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	67
1.1. Genotipado	69

2. DISEÑO EXPERIMENTAL 1: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LESIÓN AGUDA.	
MICROSCOPIA INTRAVITAL	71
2.1. Genotipo, edad, número y mantenimiento	71
2.2. Procedimiento experimental para el desarrollo de la ventana craneal	71
2.3. Aplicación de los compuestos	72
2.4. Actividad hemicanal <i>in vivo</i>	73
2.4.1. Metodología	73
2.4.2. Captura de imágenes	74
2.4.3. Procesado de imágenes y cuantificación	74
2.5. Respuesta microglial frente a daño agudo <i>in vivo</i>	74
2.5.1. Metodología	74
2.5.2. Captura de imágenes	75
2.5.3. Procesado de imágenes y cuantificación	76
2.6. Inmunofluorescencia <i>in vivo</i>	76
3. DISEÑO EXPERIMENTAL 2: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE	
NEUROINFLAMACIÓN CRÓNICA	77
3.1. Genotipo, edad, número y mantenimiento	77
3.2. Tratamientos farmacológicos	77
3.3. Pruebas comportamentales	77
3.3.1. Laberinto de agua o Morris water maze (MWM)	78
3.3.2. Laberinto en cruz elevado o Elevated plus maze (EPM)	79
3.4. Sacrificio de los animales y recogida de muestras	80
3.5. Análisis de la expresión génica	80
3.5.1. Extracción de RNA y retrotranscripción	81
3.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	81
3.6. Determinación de los niveles de citoquinas por ELISA	82
3.7. Cuantificación de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ mediante ELISA	83
3.8. Análisis de la expresión de proteínas por <i>Western-blot</i>	83
3.9. Determinación de los niveles de endocannabinoides	84

3.10. Técnicas histológicas	85
3.10.1. Procesado histológico	85
3.10.2. Tinción de hematoxilina-eosina	85
3.10.3. Inmunohistoquímica	86
3.10.4. Tinción de placas con Tioflavina S	87
3.10.5. Obtención y análisis de imágenes	87
3.10.5.1. Astrogliosis y microgliosis	87
3.10.5.2. Placas de amiloide	88
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
RESULTADOS	89
1. DISEÑO EXPERIMENTAL 1: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LESIÓN AGUDA.	
MICROSCOPIA INTRAVITAL	91
1.1. Caracterización de la actividad hemicanal <i>in vivo</i> en ratones FAAH ^{+/+}	92
1.2. Análisis de la actividad hemicanal astrocitaria frente a un estímulo lesivo	96
1.2.1. Estudio comparativo de la actividad hemicanal entre ratones	
FAAH ^{-/-} y FAAH ^{+/+}	96
1.3. Efecto de la AEA y URB597 sobre la actividad hemicanal	99
1.4. Estudio de la respuesta microglial frente a daño agudo del parénquima	
cerebral	100
2. DISEÑO EXPERIMENTAL 2: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE	
NEUROINFLAMACIÓN CRÓNICA	104
2.1. Caracterización del modelo 5XFAD a los 3 meses de edad	104
2.1.1. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial	105
2.1.2. Expresión de los parámetros inflamatorios	105
2.2. Caracterización del modelo 5XFAD a los 6 meses de edad	106
2.2.1. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial	107
2.2.2. Evaluación conductual en el laberinto elevado en cruz	108
2.2.3. Efecto de URB597 y SR1 sobre el aprendizaje y memoria espacial	108

2.2.4. Expresión de parámetros inflamatorios tras el tratamiento con URB597 y SR1	109
2.2.5. Efectos de la inactivación de FAAH sobre los parámetros inflamatorios	111
2.2.6. Análisis de las citoquinas inflamatorias por ELISA	112
2.2.7. Cuantificación de depósitos extracelulares de A β	113
2.2.8. Cuantificación de los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂	114
2.2.9. Análisis de la gliosis mediante inmunohistoquímica	115
DISCUSIÓN	117
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXO	201

RESUMEN / SUMMARY

SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative brain disease and the most common cause of dementia. It is characterized by a progressive decline in cognitive function including memory, thinking, judgment and behaviour. A small percentage of Alzheimer's cases, develop as a result of mutations to any of three specific genes: amyloid precursor protein (APP), and presenilins (PS1 and PS2); but the vast majority of AD is not genetically inherited, and experts believe that Alzheimer's, like other common chronic diseases, develops as a result of multiple factors rather than a single cause. While age is the greatest risk factor, Alzheimer's is not a normal part of aging, and age alone is not sufficient to cause the disease.

The pathological hallmarks of AD are the progressive accumulation of the protein fragment amyloid beta ($A\beta$) outside neurons, and the tangles inside neurons composed of hyperphosphorylated tau protein. These changes are eventually accompanied by the damage and death of neurons, increased levels of inflammation and oxidative stress. This inflammatory response is mediated by microglia, astrocytes, complement components and proinflammatory enzymes and proteins.

The prevalence of AD is increasing worldwide as the population ages, and the financial costs of managing AD are enormous. Thus, the World Health Organization (WHO) declared dementia as a public health and social care priority worldwide.

Currently none of the treatments available today slows or stops the damage to neurons that causes Alzheimer's symptoms. To date, established treatments are only symptomatic in nature, trying to counterbalance the neurotransmitter disturbance of the disease.

Numerous studies carried out in the last decade have shown the therapeutic potential of cannabinoids for the treatment of multiple pathologies. Manipulation of the endocannabinoid system (ECS) offers the potential to upregulate neuroprotective mechanisms, providing neuroprotection and reducing neuroinflammation. These properties would be beneficial in the treatment of AD. Several studies reported the role of ECS as an important modulator of various central nervous system processes, such as neuroprotection, memory and learning, key features of AD. Thus, modification of the endocannabinoids levels could

have a beneficial effect on this disease. Based on these evidences, we hypothesize that the enhancement of endocannabinoid tone by blocking the activity of fatty acid amide hydrolase (FAAH), could be a promising therapeutic approach in the context of neuroinflammation.

The aim of this study was to explore the neuroprotective role of the ECS in neuroinflammatory conditions. Therefore, we examined the role of FAAH in glial cells in both, acute and chronic neurodegenerative conditions: 1) *In vivo* model of acute injury. To that end, we took advantage of transgenic mice Cx3cr1^{+/GFP}, in which all microglia are fluorescently labeled with GFP. 2) *In vivo* model of chronic neuroinflammation. To that end we used a mouse model of AD (5XFAD).

In both experimental models, in order to analyze the role of FAAH, we have generated the transgenic mice: Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{-/-} and 5XFAD/FAAH^{-/-}, thus this enzyme remains inactivated, and it is a useful tool to study its genetic function *in vivo*.

In the first project we have used intravital microscopy to analyze the role of the ECS in the glial response against an acute insult. To that end, a cranial window was opened to obtain direct access to the brain parenchyma, and the laser ablation was carried out by focusing a two-photon laser beam in the superficial layer of the cortex.

The first step was to characterize the astrocytic hemichannel activity prior (basal) and after lesion (post-lesion) induction. Furthermore opening of astrocytic membrane hemichannels of FAAH^{+/+} were compared to FAAH^{-/-} mice. Our present results show that AEA (the main substrate for FAAH) regulates the opening of astrocytic hemichannels. In addition the present data indicate that AEA was able to induce an increase in hemichannel activity when applied topically, as shown by increased EtBr uptake. In contrast, exposure to the FAAH inhibitor, URB597 did not significantly modify EtBr fluorescence. Interestingly, the blockade of CB₁ receptors in FAAH^{-/-} mice led to a significant decrease of hemichannel activity as compared to FAAH^{+/+} mice.

In the present study we could also examine the response of microglia after the laser-induced injury. Our results indicate that FAAH inhibition enhanced the microglial response against an acute injury, so that the processes of the nearby cells rapidly reached the damaged site, controlling the extent of injury. Our data

showed no role for the CB₂ receptor, and suggest that these effects seem to be mediated mainly by cannabinoid CB₁ receptors.

In addition, we also found a discrepancy between FAAH^{-/-} and URB-treated mice. The pharmacological blockade of FAAH with URB597 did not modify the ability of microglial cells to respond to laser-induced damage. This divergence is suggestive of long-term adaptations in FAAH^{-/-} mouse that are not obtained with the pharmacological blockade of the enzyme, or maybe a maintained increase in endocannabinoids (in time and/or magnitude) is required to achieve same effects.

It has been recently shown that astrocytic hemichannel activity is increased by inflammation and that an inverse correlation between hemichannels and gap junctions activities exists under inflammatory conditions. Based on these results, one could hypothesize that AEA, a well-known gap junction inhibitor, could contribute to exacerbate the hemichannel activity.

In conclusion, our results show that AEA , enhances the microglia shielding process when an acute injury is induced in the brain parenchyma and this phenomenon may be, at least in part, explained by the increased astrocytic hemichannel activity induced by this endocannabinoid. To the best of our knowledge, these are the first data indicative of a direct role of this endocannabinoid on the *in vivo* interplay between microglia and astrocytes, and that AEA is a relevant mediator of astrocytic and microglial functions and plays a neuroprotectant role in the acutely damaged brain.

In the second project we have evaluated the effect of the genetic inhibition of FAAH in a mouse model of AD (5xFAD). This transgenic model develop plaque deposition, neuron loss and gliosis starting already at the age of 2 months.

First, spatial memory acquisition was tested with the Morris water maze (MWM) test. 5XFAD mice showed memory impairment, as has been previously reported, but this was not modified by pharmacologic inactivation of FAAH (URB597). In contrast the genetic inactivation of FAAH (5XFAD/FAAH^{-/-}) prevented the memory deficit in 5XFAD mice, showing a significant improvement in their ability to acquire spatial memory in MWM. These data confirm our previous observations (in the first project) of differential effect of pharmacologic compared with genetic blockade of FAAH and subsequent increase in endocannabinoid levels. This discrepancy is suggestive of long-term adaptations in the FAAH^{-/-} mouse that are not obtained with a short-term pharmacologic blockade of the enzyme, and may indicate that a maintained increase in endocannabinoids (in time and/or magnitude) is required for effects to be achieved.

Importantly, treatment with the specific CB₁ antagonist (SR1) did not revert this effect of the genetic deletion of FAAH, suggesting that additional CB₁-independent mechanisms might contribute to AEA effects or that the experimental paradigm employed (time and dose) could not be sufficient to translate the molecular alterations observed into the same phenotypic changes as those observed in FAAH^{-/-} mice.

We next analyzed amyloid levels and neuritic plaques, and we found a significant decrease of both quantifications in 5XFAD/FAAH^{-/-} mice compared with 5XFAD mice. We next determined whether the observed decrease in amyloid levels and neuritic plaques could be because of changes in several of the proteins involved in amyloid production. Our results showed that only APP levels were significantly decreased as a consequence of FAAH genetic inactivation. In summary our data reveal that the enhancement of the endocannabinoid tone alters the production of amyloid peptides, and this alteration includes significant decreases in the amount of total APP, soluble A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides and neuritic plaque density, suggesting FAAH as a promising enzyme target for therapeutic strategy.

Microgliosis and astrogliosis was confirmed by immunohistochemical analyses. Results showed a significant reduction in plaque-associated in 5XFAD/FAAH^{-/-} mice. We also analyzed the activational state of microglial cells by labelling with CD68, a phenotypic marker that is known to be up-regulated in activated microglia. Our results showed that, contrary to the observed decrease in the total number of microglial cells, levels of activated cells were similar in both 5XFAD/FAAH^{+/+} and 5XFAD/FAAH^{-/-} mice. Based on these results we could speculate that FAAH inhibition induces a phenotypic switch in microglial cells that contributes to prevent plaque formation and disease progression.

Finally, 5XFAD mice showed increased mRNA levels of several key inflammatory cytokines, as could be expected as a consequence of the disease. Paradoxically 5XFAD/FAAH^{-/-} mice exhibited higher levels of pro-inflammatory cytokines and specifically, of IL1 β , but without a significant increase in protein levels.

To the best of our knowledge, these data are the first showing a FAAH-related decrease in amyloid deposition *in vivo* and are indicative of a beneficial effect of FAAH inactivation. In addition, the presence of activated microglial cells was similar in 5XFAD and 5XFAD/FAAH^{-/-} mice. Taken together, these observations suggest that the genetic inactivation of FAAH induces multiple effects including

decreased production and formation of amyloid precipitates into neuritic plaques, microglial overactivation, and cytokine production.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo asociado a la edad, en el cual hay una alteración de múltiples funciones incluyendo la memoria, el pensamiento, el juicio y el comportamiento. A excepción de algunos casos de Alzheimer causados por mutaciones genéticas, los expertos creen que la enfermedad se desarrolla debido al resultado de múltiples factores y no a una única causa, aunque la edad es el principal factor de riesgo.

El curso de la enfermedad está muy relacionado con los cambios neuropatológicos que ocurren en el cerebro de estos pacientes. Estos cambios se caracterizan fundamentalmente por el deterioro de la neurotransmisión en diferentes áreas del SNC, debido a la formación de las denominadas placas neuríticas, consistentes en acumulaciones extraneuronales de la proteína β -amiloide ($A\beta$), y a la aparición de ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*) en el citoplasmas de las neuronas, compuestos principalmente de la proteína tau hiperfosforilada. Ambas lesiones histopatológicas constituyen los dos elementos distintivos de la enfermedad y conllevan la pérdida progresiva de neuronas y sinapsis. Además, en el curso de la enfermedad se desencadenan otros procesos, como la neuroinflamación y el estrés oxidativo, que contribuyen a la neurodegeneración. En este proceso de inflamación crónica denominado gliosis reactiva, se van a ver involucrados los astrocitos y las células de microglía, así como el sistema del complemento y diferentes enzimas y proteínas proinflamatorias.

La alta prevalencia mundial en la población de edad avanzada, así como el creciente impacto socio-económico que supondrá en las próximas décadas, han supuesto que la EA sea considerada por la Organización Mundial de la Salud como una prioridad de salud pública.

En la actualidad, no se dispone de ningún tratamiento para retrasar o detener el daño cerebral que provoca la EA, aunque se encuentran disponibles algunos tratamientos que pueden aminorar los síntomas o disminuir su progresión.

Las investigaciones realizadas en el campo de los cannabinoides han avanzado enormemente en la última década debido a sus posibles aplicaciones terapéuticas en diversas patologías, y están poniendo de manifiesto que la modulación del sistema endocannabinoide (SEC) podría proporcionar beneficio terapéutico en diversas patologías, como la EA, debido a sus propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes.

Existen evidencias del papel del SEC en distintos procesos cerebrales tales como la neuroprotección, la memoria y el aprendizaje, aspectos claves en la EA. Por tanto la manipulación del tono endocannabinoide podría ser relevante y beneficiosa. Considerando estas evidencias, se planteó la hipótesis de que el incremento del nivel de endocannabinoides en el cerebro, a través de la inhibición de la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), podría constituir una nueva diana terapéutica.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consistió en profundizar en el potencial del SEC como posible diana neuroprotectora en un ambiente neuroinflamatorio. Para ello evaluamos el posible papel neuroprotector de la enzima FAAH en la actividad glial, en distintas situaciones de inflamación: 1) Modelo *in vivo* de daño agudo. Para este fin, se usó el modelo de ratón Cx3cr1^{+/GFP}, que expresa la proteína GFP en las células de microglía. 2) Modelo *in vivo* de neuroinflamación crónica con ratones 5XFAD, que constituyen un modelo animal bien establecido de la EA.

En ambos casos, y con el fin de dilucidar el papel de la enzima FAAH en un entorno inflamatorio, se generaron las líneas: Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{-/-} y 5XFAD/FAAH^{-/-}, de esta manera, la enzima FAAH permanece inactiva, disponiendo así de una herramienta muy útil para el estudio de su función genética *in vivo*.

En la primera parte (diseño experimental I), la Tesis se centra en el estudio de la respuesta glial en un modelo de daño agudo. Para realizar este estudio hemos empleado un sistema de microscopía intravital para la observación de la corteza cerebral del ratón a través de una ventana craneal y con un láser pulsado de femtosegundos llevamos a cabo la ablación láser en el parénquima cerebral.

Nuestro primer objetivo consistió en realizar un estudio de la actividad hemicanal astrocitaria en condiciones basales, y tras el efecto de la lesión láser. Además, con el fin de evaluar si la inactivación de FAAH pudiera tener efecto sobre la apertura de los hemicanales, se realizó una comparación entre ratones FAAH^{+/+} y FAAH^{-/-}. Los resultados obtenidos sugieren que el aumento en los niveles de AEA a través de la inactivación de FAAH, estaría potenciando la apertura de los hemicanales astrocitarios. Además, pudimos comprobar que la aplicación directa de AEA (principal sustrato para la enzima FAAH) sobre la corteza cerebral potenció la apertura de los hemicanales, observándose un incremento significativo en la captación de BrEt; sin embargo, un inhibidor irreversible de la enzima FAAH como es el URB597, no modificó la actividad hemicanal.

Nuestros datos sugieren además, la participación de los receptores CB₁ en el incremento de la actividad hemicanal observada en los ratones FAAH^{-/-}, y confirman la mediación ya conocida de AEA a través de estos receptores.

En el presente trabajo también hemos podido evaluar la respuesta microglial frente a un daño agudo causado por una ablación láser en el parénquima cerebral. Tras este tipo de lesión, los procesos celulares se dirigen rápidamente hacia el foco lesivo encapsulando el daño causado, y limitando así la propagación del mismo. Nuestros datos sugieren que únicamente los receptores CB₁ parecen participar en esta respuesta exacerbada y descartan la participación de los receptores CB₂.

Por otro lado, en el presente trabajo hemos observado una discrepancia entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH. El hecho de que un potente inhibidor irreversible de FAAH como es URB597 no modificase la actividad hemicanal, ni la respuesta microglial, sugiere que es necesario incrementar los niveles de endocannabinoides de forma mantenida (en tiempo y/o magnitud), para desembocar en los efectos encontrados. De forma alternativa, puede que estos ratones FAAH^{-/-} hallan sufrido, como respuesta a la inhibición genética, una adaptación evolutiva que no se puede lograr a través de la inhibición farmacológica.

Finalmente, quisimos conocer si existía algún tipo de relación entre la actividad hemicanal astrocitaria y la respuesta microglial. Según se describió anteriormente, los datos de actividad hemicanal revelaron que tanto el aumento del tono endocannabinoide en ratones FAAH^{-/-}, como la exposición a AEA, producían un aumento de la entrada de BrEt en astrocitos, indicativo de activación hemicanal. Por otra parte, es importante mencionar que en situaciones de inflamación, existe una correlación inversa entre la actividad hemicanal y *gap junctions*. Teniendo en cuenta todo esto, resulta tentador especular que la AEA, considerada un potente inhibidor de las *gap junctions*, podría estar ejerciendo una función inhibitoria sobre estas, y potenciadora sobre los hemicanales.

Por tanto, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos sugerir que el incremento de la actividad hemicanal basal en los ratones FAAH^{-/-}, podría explicar al menos en parte el incremento significativo de la respuesta microglial observada en estos ratones con respecto a los WT. Como conclusión proponemos que, la AEA podría modular la actividad de los hemicanales Cx43, provocando un aumento de la liberación de ATP y promoviendo así un mecanismo neuroprotector al incrementar la respuesta microglial hacia la lesión.

En conclusión, los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que la AEA, a través de la modulación de los hemicanales astrocitarios, podría regular la respuesta microglial y proporcionar neuroprotección en situaciones de daño cerebral agudo.

En la segunda parte (diseño experimental II) de esta Tesis Doctoral se estudiaron las consecuencias de la inhibición de FAAH en un modelo *in vivo* de neuroinflamación crónica. Para ello usamos en modelo transgénico 5XFAD, que presenta una aparición muy temprana de placas amiloides, pérdida neuronal y gliosis a los 2 meses de edad.

En un primer estudio analizamos las alteraciones cognitivas a través de la prueba en el laberinto de agua, conocido como *Morris Water Maze* (MWM), y comprobamos que el deterioro cognitivo encontrado en los ratones 5XFAD a los 6 meses de edad, no se veía modificado ni por la inactivación farmacológica de FAAH (mediante el tratamiento con URB597), ni por el bloqueo de los receptores CB₁. Sin embargo, los estudios realizados en el MWM con ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}, mostraron que la inactivación genética de FAAH producía una mejoría significativa en la memoria espacial y el aprendizaje. Esta discrepancia encontrada entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH, la habíamos observado previamente en el Diseño experimental I, y sugiere que aunque el URB597 sea un potente inhibidor irreversible de la FAAH, no es capaz de mimetizar la respuesta producida a través de la inhibición genética.

La razón para esta falta de efecto encontrada tras el tratamiento con URB597 no está clara, aunque nuestros resultados sugieren que es necesario incrementar los niveles de endocannabinoides de forma mantenida (en tiempo y/o magnitud), para desembocar en los efectos encontrados en este modelo de neuroinflamación crónica. De forma alternativa, puede que estos ratones FAAH^{-/-} hayan sufrido, como respuesta a la inhibición genética, una adaptación evolutiva que no se puede lograr a través de la inhibición farmacológica.

Por otra parte, hemos podido comprobar que este efecto encontrado en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} es independiente de los receptores CB₁, tal y como muestran los resultados tras el tratamiento con el antagonista SR₁, lo que sugiere la participación de otros receptores.

También se realizó una cuantificación de los depósitos extracelulares de A β fibrilar, y de la expresión de APP, BACE y PSN. Los resultados de este estudio mostraron que el incremento del tono endocannabinoide, a través de la

inhibición de FAAH, produce importantes alteraciones en el procesamiento y producción del péptido amiloide, que se ven reflejadas en 1) una reducción de los depósitos extracelulares de A β ; 2) un descenso en los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂; y 3) una reducción de la proteína APP, sugiriendo así una vez más el posible potencial terapéutico de la modulación de la enzima FAAH.

Por otra parte, los resultados del estudio inmunohistoquímico para analizar la micro- y astro-gliosis, mostraron un perfil proinflamatorio en los ratones 5XFAD, característico de la enfermedad. Y en el caso de los ratones con la enzima FAAH inactivada (5XFAD/FAAH^{-/-}), se observó un descenso en la micro- y astro-gliosis que estaría asociado con el descenso encontrado en la deposición de A β extracelular que anteriormente comentábamos.

En vista a estos resultados, decidimos llevar a cabo un estudio cuantitativo de activación microglial, a través del marcaje con CD68, ampliamente usado como marcador de células microgliales activadas. Los resultados revelaron que, al contrario de la disminución observada en el número total de células microgliales, en los niveles de microglía activada apenas existían diferencias entre los animales 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}, es decir, en los ratones 5XFAD no toda la microglía estaba activada y en los ratones con la enzima FAAH inactivada prácticamente toda la microglía sí está activada. Y por lo tanto, podríamos especular que en estos ratones se induce un cambio de fenotipo en la microglía, que podría contribuir de forma beneficiosa frenando la formación de placas y así la progresión de la enfermedad.

Por último, decidimos analizar los parámetros inflamatorios, y los resultados obtenidos por PCR cuantitativa mostraron una vez más el perfil proinflamatorio de los animales 5XFAD. Sin embargo, paradójicamente, los animales 5XFAD/FAAH^{-/-} presentaron un incremento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias (IL1 β , IL6 y TNF α), específicamente de IL1 β , en comparación con los 5XFAD, lo cual puede resultar contradictorio teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el MWM y en el análisis inmunohistoquímico.

En resumen, los resultados del presente trabajo, ponen de manifiesto que la inactivación de FAAH induce múltiples efectos en la patología amiloide, entre los que se incluyen: la disminución de los niveles de A β soluble y de placas neuríticas, y la inducción de un fenotipo proinflamatorio, que paradójicamente tiene efectos beneficiosos que provocan la activación de la microglía asociada a placas, incrementando de esta forma su capacidad fagocítica.

INTRODUCCIÓN

1. CANNABINOIDES

Los cannabinoides son compuestos químicos presentes en las plantas del género *Cannabis* (*C. sativa*, *C. indica* y *C. ruderalis*), comúnmente conocidas como cáñamo o marihuana. Estos compuestos se caracterizan por tener una estructura carbocíclica de 21 carbonos y generalmente están formados por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. Dependiendo de su fuente de procedencia se pueden agrupar en: fitocannabinoides, los cuales hacen referencia a los cannabinoides que provienen únicamente de la planta de *Cannabis sativa* (se han identificado cerca de 70 fitocannabinoides distintos); endocannabinoides, ligandos endógenos naturales producidos por casi todos los organismos animales, incluidos los humanos; y cannabinoides sintéticos, diseñados con actividad cannabimimética para reproducir la mayoría de los efectos descritos para los derivados del cannabis.

La planta de *Cannabis sativa* L. se ha utilizado como planta medicinal desde hace miles de años. Las primeras evidencias de su uso medicinal se originan en China e India, donde se le atribuían propiedades analgésicas, hipnóticas, anestésicas y antiinflamatorias (Ben Amar, 2006). Pero a pesar de su larga historia, no fue hasta mediados del siglo XIX cuando se introdujo el cannabis con uso terapéutico en Europa occidental (Figura 1). Este hecho fue impulsado por el Dr. William O'Shaughnessy, quien inició los primeros estudios clínicos del cannabis en humanos, con preparaciones de cáñamo procedente de la India (O'Shaughnessy, 1843). A raíz de estos estudios donde demostró que sus preparaciones a base de cannabis tenían efectos anticonvulsivantes, muchas compañías farmacéuticas comercializaron estos extractos, que fueron prescritos por muchos doctores para tratar el dolor, el asma y como agente hipnótico o sedante (Fankhauser, 2002). Sin embargo, el uso del cannabis como medicina desapareció casi por completo a mediados del siglo XX, las principales razones fueron: la potencia variable de los distintos extractos cannabinoides; la introducción de fármacos sustitutos como la aspirina, los barbitúricos y la morfina; algunos efectos adversos como ansiedad y deterioro cognitivo; y las restricciones legales respecto al uso en medicina de derivados cannabinoides (Frankhauser, 2002).

Introducción

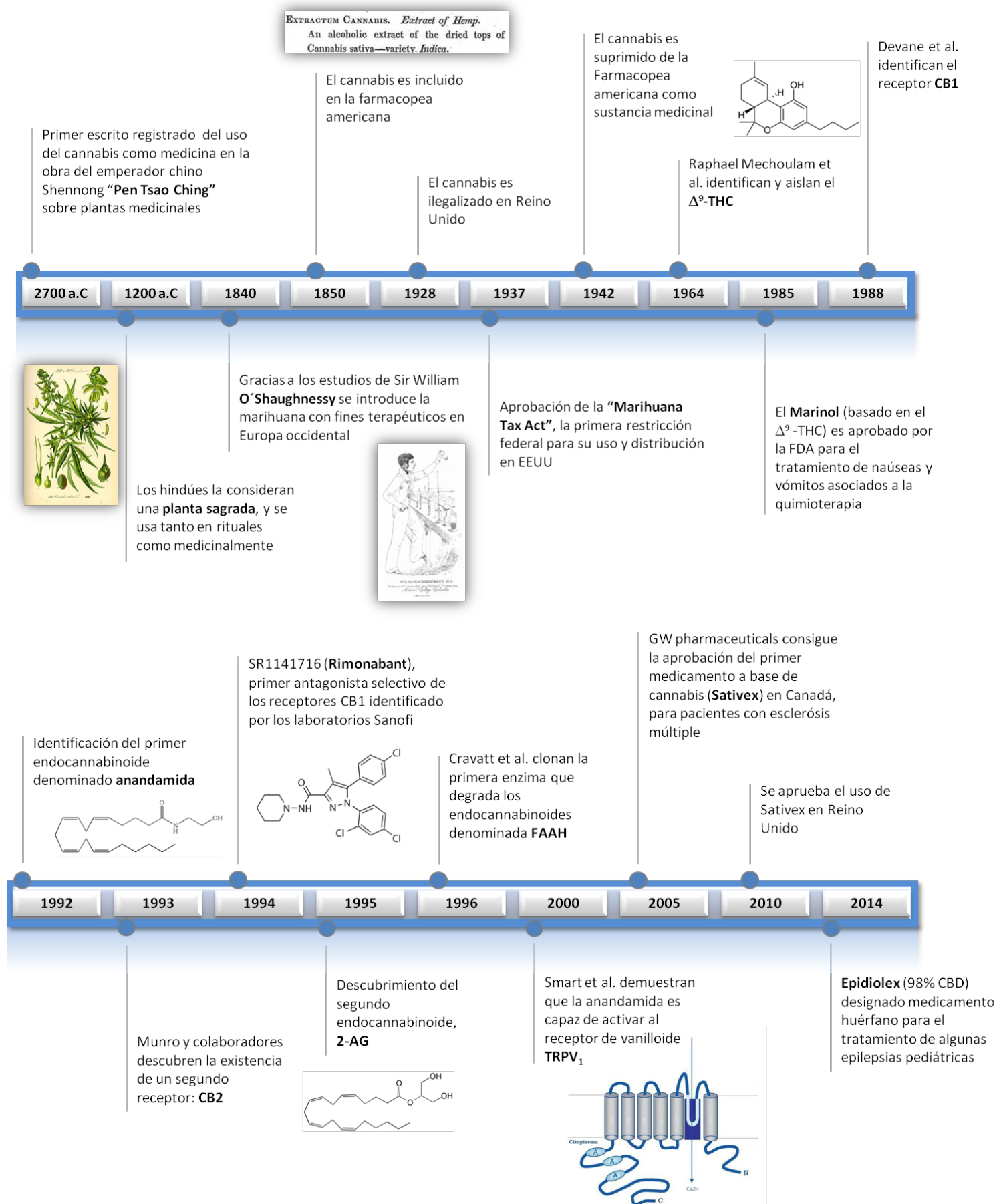


Figura 1. Línea temporal: Historia de los cannabinoides.

Hoy la situación ha cambiado considerablemente debido al auge que ha experimentado la investigación sobre cannabinoides en las diferentes disciplinas científicas (Figura 1). En 1964 Raphael Mechoulam y colaboradores identificaron el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), principal componente del cannabis y responsable de sus efectos psicotrópicos (Mechoulam et al., 1965; Mechoulam et al., 1970), y desde entonces, en los últimos 50 años se han hecho grandes avances que han llevado a la comunidad científica a descubrir y caracterizar en el cuerpo humano y en otros mamíferos, un sistema de señalización endógena conocido como sistema endocannabinoide (SEC), el cual está implicado en múltiples procesos fisiológicos y cuyas alteraciones están relacionadas con diversos tipos de patologías.

1.2. Sistema endocannabinoide

El SEC es un sistema regulador implicado en modular una gran variedad de procesos fisiológicos. Está constituido por receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos y las enzimas encargadas de su síntesis y degradación (Gaoni & Mechoulam, 1964).

Existen evidencias del papel del SEC en dolor, inflamación, metabolismo energético, distintas neuropatologías, además de sistema inmune, cardiovascular y hepático (Di Marzo, 2008).

1.2.1. Receptores cannabinoides

Los cannabinoides, ya sean los ligandos endógenos, como los procedentes de la planta *C.sativa*, ejercen sus efectos farmacológicos mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento, se han identificado dos receptores para cannabinoides: los receptores CB₁ y CB₂ (Figura 2). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, que se caracterizan por la presencia de siete dominios transmembrana (Palczewski et al., 2000).

El carácter altamente lipofílico de los cannabinoides naturales dificultó durante muchos años la identificación de estos receptores. El primer receptor caracterizado fue el receptor CB₁ (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990), este se expresa principalmente en el cerebro y está altamente conservado entre las distintas especies, siendo la homología entre humano y ratón del 91% (Valenti et al., 2005). Poco después se describió la existencia del receptor CB₂, (Munro et al., 1993) que en humanos comparte una homología global del 44% con los

receptores CB₁, pero que a diferencia de estos, se localiza principalmente a nivel periférico y es más divergente en cuanto a su homología, siendo de un 81% entre humano y rata (Begg et al., 2005).

La disponibilidad de antagonistas de ambos receptores (Rinaldi-Carmona et al., 1994; Rinaldi-Carmona et al., 1998), así como la obtención de ratones deficientes del receptor CB₁ o CB₂ (Valverde et al., 2005; Buckley, 2008) han sido de gran ayuda para poder establecer el papel de los endocannabinoides en diversos procesos fisiológicos, y constituyen una excelente herramienta para estudiar el papel biológico de ambos receptores.

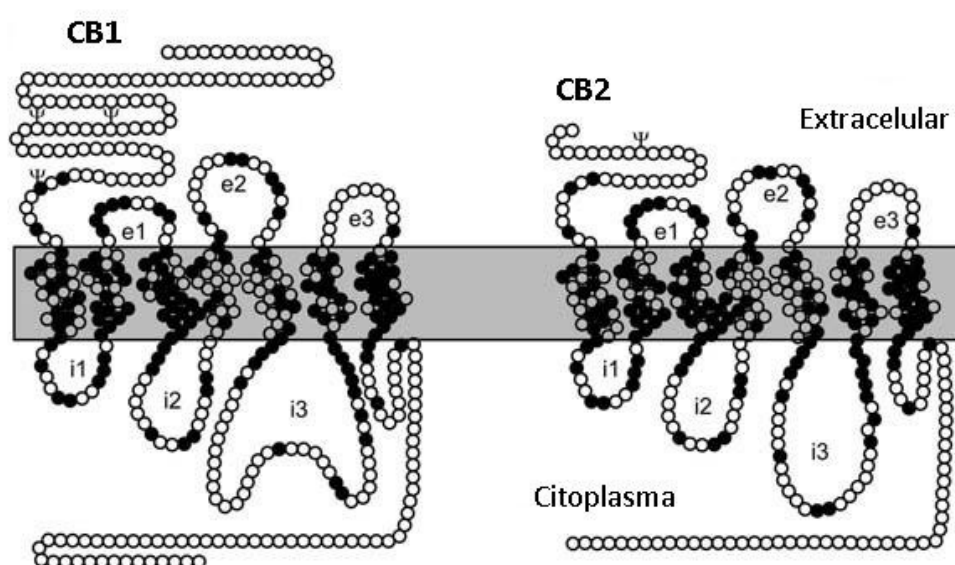


Figura 2. Estructura de los receptores CB₁ y CB₂. Aminoácidos comunes en ambos receptores (círculos negros); aminoácidos diferentes (círculos blancos); asas extracelulares (e1, e2, e3); asas intracelulares (i1, i2, i3); sitios de glicosilación (Ψ) (Erdozain et al., 2009).

1.2.1.1. Receptor CB₁

El receptor CB₁ consta de 472-473 aminoácidos organizados en una secuencia típica de receptores acoplados a proteínas G. El análisis de su secuencia primaria muestra la presencia de siete dominios transmembrana hidrofóbicos que se extienden a través de la membrana plasmática, y se encuentran conectados por tres bucles extracelulares y tres intracelulares (Figura 2). Poseen también un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular (Figura 2). Además, contiene tres sitios potenciales de glicosilación en el extremo amino terminal extracelular.

Se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC), mayoritariamente a nivel presináptico. Gracias a diferentes técnicas autorradiográficas y diversos estudios inmunohistoquímicos, se ha descrito de forma detallada su distribución en el cerebro de rata (Figura 3) (Herkenham et al 1990; Mailleux & Vanderhaeghen 1992; Tsou et al., 1998). La mayor densidad de receptor CB₁ se encuentra en los ganglios basales (sustancia nigra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado putamen lateral), amígdala, capa molecular del cerebelo e hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y giro dentado). Su densidad es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras que un escaso número de receptores se encuentra en hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal.

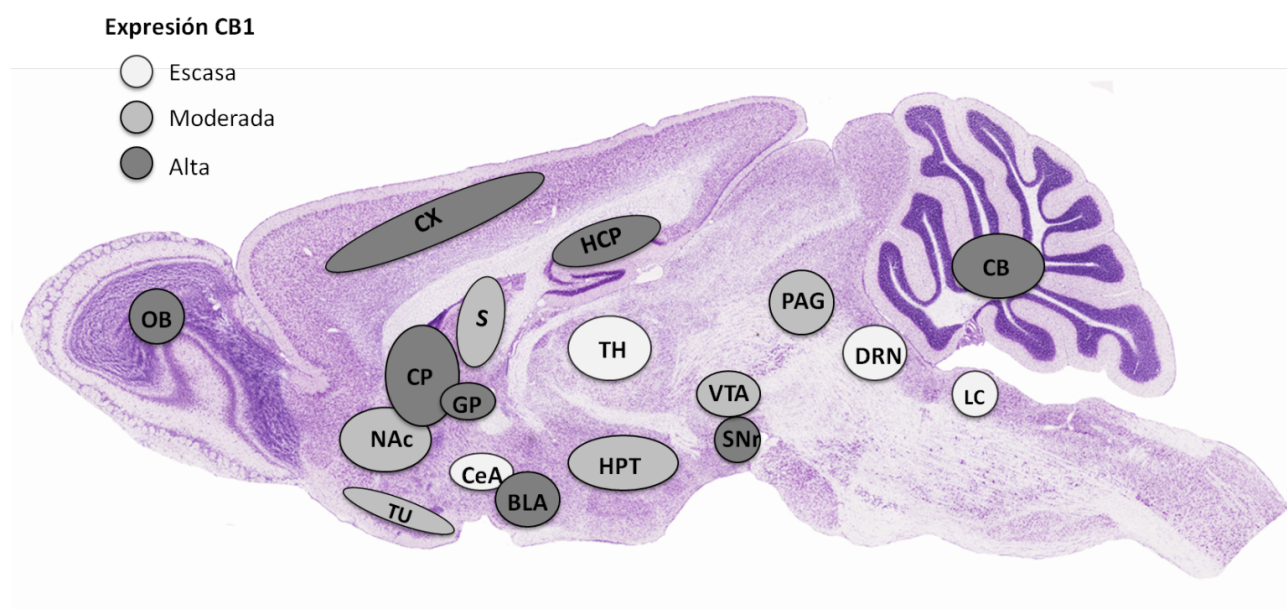


Figura 3. Representación esquemática de la distribución de los receptores CB₁ en el SNC de rata adulta. La expresión de CB₁ se muestra con círculos que indican una densidad escasa (blanco), moderada (gris claro) o alta (gris oscuro). OB, bulbo olfatorio; CX, corteza cerebral; HCP, hipocampo; S, septo; CP, caudado putamen; NAc, núcleo accumbens; GP, globo pálido; TU, tubérculo olfatorio; CeA, amígdala central; BLA, amígdala basolateral; TH, tálamo; HPT, hipotálamo; VTA, área ventral tegmental; SNr, sustancia nigra; PAG, gris periacueductal; DRN, núcleo dorsal del rafe; LC, locus cerúleo; CB, cerebelo. Imagen adaptada de Mackie, 2005.

La distribución de estos receptores se encuentra estrechamente relacionada con los efectos fisiológicos y farmacológicos que producen los cannabinoides. Así, la alta densidad de receptores CB₁ en los ganglios basales se relaciona con los efectos que estos compuestos ejercen sobre la actividad motora. La presencia de estos receptores en áreas hipocámpales y corticales explica los efectos sobre el

aprendizaje y la memoria así como las propiedades anticonvulsivantes de los mismos. En cuanto a la localización periférica se sabe que está presente en diversos tejidos como bazo, amígdalas, pulmón, corazón, próstata, útero, ovario y tejido adiposo (Mackie, 2008; Pertwee et al., 2010).

1.2.1.2. Receptor CB₂

El receptor CB₂ consta de 360 aminoácidos, por lo que hay una diferencia considerable de tamaño entre ambos receptores. Comparte un 68% de homología con el receptor CB₁ si consideramos solo los dominios transmembrana, y un 44% de homología con respecto al total de la proteína. Además, consta de un amino terminal extracelular glicosilado y un extremo carboxilo terminal intracelular.

En cuanto a su distribución, se encuentra mayoritariamente en sistema inmune, siendo muy abundante en bazo, amígdala y distintos tipos de células inmunes como macrófagos, linfocitos T y B, *natural killer* y monocitos (Galiegue et al., 1995). Tras años de gran controversia, ahora podemos decir que la expresión de CB₂ no es estrictamente periférica y también se encuentra en SNC. Sin embargo, las condiciones bajo las cuales se puede expresar CB₂ y en qué tipos celulares se expresa son aún tema de debate. Esto se debe a que en comparación con el receptor CB₁, CB₂ aún no está bien caracterizado, entre otros motivos por la falta de especificidad de los *primers* a la hora de detectar distintas isoformas del receptor mediante PCR (Brown et al., 2002), la falta de anticuerpos selectivos disponibles para los estudios inmunohistoquímicos, los niveles bajos de expresión en el cerebro y las limitaciones de los modelos de ratón CB₂ *knockout* existentes (Buckley et al., 2000; revisado en Atwood & Mackie, 2010).

En situaciones patológicas (como en la enfermedad de Alzheimer, EA) se induce la expresión de CB₂ en células de microglía asociadas a placas (Benito et al., 2003; Ramírez et al., 2005; Solas et al., 2013). Sin embargo, respecto a la presencia de CB₂ en cerebro sano sigue habiendo gran controversia, ya que hay numerosos estudios que no han detectado expresión de CB₂ (Munro et al., 1993; Griffin et al., 1999; Buckley et al., 2000), mientras que otros sí han descrito expresión. Por citar algunos ejemplos, se ha identificado CB₂ en glía, en una subpoblación de microglía vascular rodeando los vasos sanguíneos, llamada microglía perivascular (Nuñez et al., 2004; Ashton et al., 2006). Con posterioridad y de forma todavía más controvertida se ha identificado también expresión de CB₂ en neuronas de diferentes regiones cerebrales como

hipocampo, corteza cerebral, estriado, amígdala y tallo cerebral (Onaivi et al., 2006; Gong et al., 2006; Van Sickle et al., 2005).

1.2.2. Mecanismos de transducción de señales mediados por los receptores cannabinoides

La transducción de señales a través de estos receptores tiene lugar fundamentalmente debido a su interacción con las proteínas G, constituidas por las subunidades α , β y γ . Cuando el receptor es activado por un ligando, se inducen cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G, lo que hace que aumente la afinidad de la subunidad α por GTP, y se produzca el distanciamiento con el complejo $\beta\gamma$. Tanto la subunidad α como las subunidades $\beta\gamma$ pueden actuar sobre diferentes moléculas efectoras, activando o inhibiendo gran variedad de segundos mensajeros.

1.2.2.1. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB₁

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores CB₁ incluyen la inhibición de la adenilato ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos, la activación de la fosfolipasa C (PLC) y de la cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) (Howlett, 1998) (Figura 4).

La activación de los receptores CB₁ a través de la subunidad α de las proteínas G inhibitoras ($G_{i/o}$), produce la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), lo que da lugar a un descenso de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. De esta forma se ve afectada la capacidad de fosforilación de las proteínas quinasas dependientes de este nucleótido cíclico, e implicadas en la síntesis de endocannabinoides (Childers & Deadwyler, 1996). Alternativamente, en algunos casos el receptor CB₁, a través de la subunidad α , puede acoplarse a proteínas G_s que estimulan la AC y producen un aumento en los niveles de AMPc intracelular (Bonhaus et al., 1998).

Otra de las enzimas que regula este receptor de cannabinoides es la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima es capaz de hidrolizar el fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), para escindirlo en dos productos: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), ambos participan en la liberación de Ca²⁺ intracelular.

La activación de los receptores CB₁ a través del dímero $\beta\gamma$ de las proteínas $G_{i/o}$, induce la inhibición de los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje, principalmente los

tipo N y tipo P/Q (Mackie & Hille, 1992; Twichell et al., 1997), que se sitúan en la membrana de neuronas presinápticas, disminuyendo así sus niveles intracelulares de Ca^{2+} . Esto posibilita la modulación de la liberación de neurotransmisores por parte de los cannabinoides. Además, el acoplamiento a través del dímero $\beta\gamma$ puede disminuir la liberación de neurotransmisores de las terminaciones presinápticas, y activar los canales de K^+ , contribuyendo a facilitar su salida de la célula (Mackie et al., 1995; Howlett et al., 2002).

La activación de los receptores CB_1 , bien a través de proteínas G o de segundos mensajeros, puede activar también la ruta de las MAPK, involucrada en la regulación de procesos tan importantes como proliferación y diferenciación celular (Bouaboula et al., 1995) y en procesos de supervivencia y muerte celular (Guzman et al., 2001).

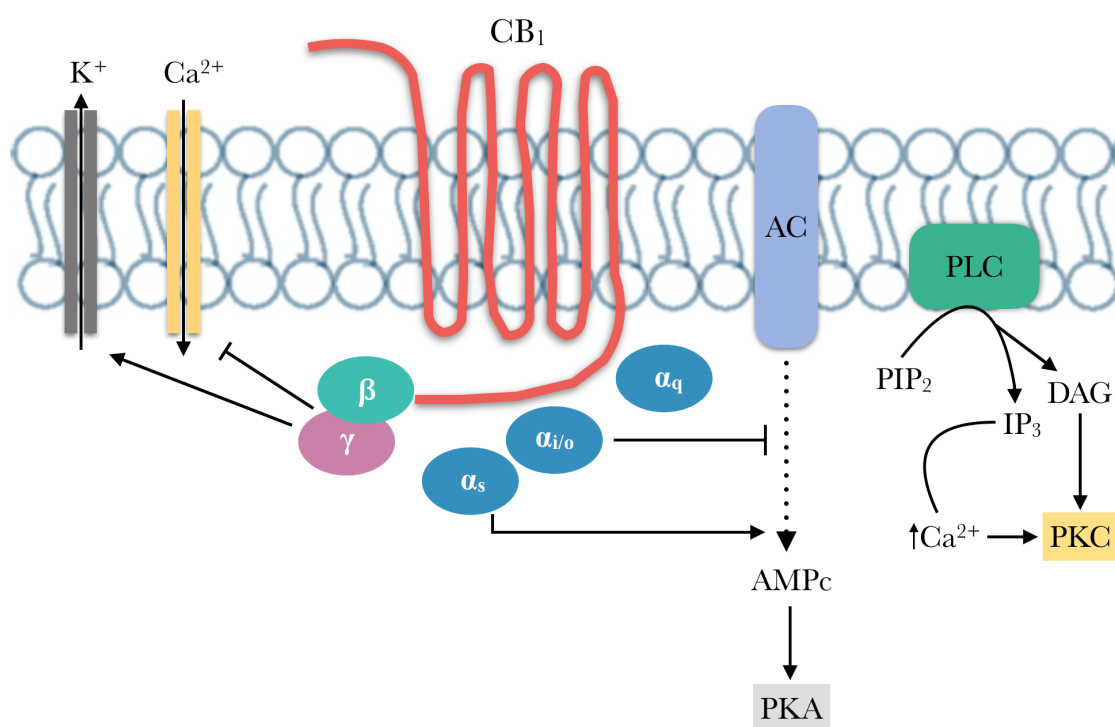


Figura 4. Principales mecanismos de transducción acoplados al receptor CB_1 .

1.2.2.2. Mecanismo de transducción de señales del receptor CB_2

En cuanto al receptor CB_2 , su activación también conduce a la inhibición de la AC a través de las proteínas $\text{G}_{i/o}$, disminuyendo los niveles de AMPc intracelulares (Bonhaus et al., 1998), e induce la activación de la vía de las

MAPK. También es capaz de modular la movilización de Ca^{2+} de ciertos tipos de células endoteliales (Zorati et al., 2003), pero a diferencia del receptor CB_1 , no es capaz de regular la funcionalidad de los canales iónicos (Felder et al., 1995).

1.2.3. Otros posibles receptores de cannabinoides

Numerosos estudios farmacológicos sugieren la existencia de otros receptores de cannabinoides adicionales a CB_1 y CB_2 , uno de ellos podría ser el receptor huérfano acoplado a proteínas G **GPR55**. Este receptor caracterizado por Ryberg y colaboradores (2007), comparte una baja homología con los receptores CB_1 y CB_2 (13 y 14% respectivamente) (Moriconi et al., 2010), y se localiza tanto en tejido periférico (Ryberg et al., 2007) como en SNC, principalmente en núcleo caudal y putamen, y en menor cantidad en hipocampo, tálamo, cerebelo, corteza frontal e hipotálamo (Baker et al., 2006; Brown, 2007; Lauckner et al., 2008; Sylantsev et al., 2013). Múltiples ligandos endocannabinoides como anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), y naturales como Δ^9 -THC, se comportan como agonistas de GPR55 (Lauckner et al., 2008; Brown, 2007).

El receptor de potencial transitorio vanilloide-1 (**TRPV₁**, del inglés *transient receptor potential vanilloid 1*) es un receptor ionotrópico termosensible que se activa con temperaturas elevadas y tiene especial importancia para la fisiología sensorial y del dolor. La capsaicina, compuesto presente en los pimientos picantes, es el agonista mejor caracterizado y más utilizado para el estudio del TRPV₁ (Caterina et al., 1997). Este receptor se expresa principalmente en neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), como neuronas del ganglio de la raíz dorsal y ganglios trigeminal y torácico vagal (Szallasi et al., 1995; Caterina et al., 1997). Pero además, también lo encontramos en distintas áreas del SNC como tálamo, hipotálamo o hipocampo (Cristino et al., 2006). La AEA es capaz de modular su activación debido a su alta afinidad por este receptor (Smart et al., 2000; Ross, 2003), y la N-araquidonoildopamina (NADA) activa de forma muy eficaz a TRPV₁ en el hipocampo (Huang et al., 2002).

Otro gran grupo de receptores sobre los que pueden actuar los cannabinoides son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (**PPARs**, del inglés *peroxisome proliferator activated receptor*). Son una familia de factores de transcripción nucleares, que a través de la formación de peroxisomas intervienen en importantes procesos tales como diferenciación celular, metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas entre otros. Existen tres isoformas: PPAR $_{\alpha}$, PPAR $_{\gamma}$ y PPAR $_{\beta/\delta}$, cada una interviene en procesos metabólicos diferentes acordes con la fisiología y el metabolismo de los tejidos donde se expresan. Las

tres isoformas se expresan en SNC, donde su papel está relacionado principalmente con el metabolismo lipídico, aunque también se ha descrito su implicación en diferenciación y muerte neuronal, así como en inflamación y neurodegeneración (Heneka & Landreth, 2007). En rata se ha detectado expresión de las tres isoformas en astrocitos, aunque en diferentes grados dependiendo del área cerebral y la edad del animal (Cullingford et al., 1998; Cristiano et al., 2001). En microglía la isoforma dominante es PPAR_γ y ha sido estudiada en detalle en procesos de inflamación y neurodegeneración (Heneka et al., 1999). En la EA esta isoforma tiene especial relevancia, ya que las terapias con fármacos antiinflamatorios no esteroideos o AINEs activan a los PPAR_γ e inhiben la respuesta inflamatoria característica en la EA (Landreth & Heneka, 2001; Kielian & Drew, 2003). En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la activación de PPAR_γ en células microgliales suprime la expresión de citoquinas proinflamatorias, la producción de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) y bloquea la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) (Combs et al., 2000), por lo que los agonistas de PPAR_γ podrían aportar un beneficio terapéutico en enfermedades que incluyan un componente inflamatorio como la EA. En cuanto a los ligandos cannabinoides capaces de modular la activación de los PPAR_α, encontramos a N-oleiletanolamina (OEA), N-palmitoil etanolamina (PEA), AEA, noladín éter y virodamina (Fu et al., 2003; Citraro et al., 2013; Sun et al., 2006). Además, AEA y 2-AG son capaces de activar los receptores PPAR_γ (Bouaboula et al., 2005) y mediar respuestas antiinflamatorias (Rockwell & Kaminski, 2004; Rockwell et al., 2006).

1.2.4. Ligandos cannabinoides

Tras la caracterización y localización de los receptores para cannabinoides, se pensó que podría haber ligandos endógenos que activaran de forma natural dichos receptores. En 1992 Mechoulam y colaboradores (Devane et al., 1992) identificaron y caracterizaron el primer endocannabinoide, la **N-araquidonil etanolamida**, también denominada anandamida (AEA) de la palabra Sánscrita *ananda*, que significa felicidad. En 1995 se identificó un segundo endocannabinoide, el **2-araquidonilglicerol** (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), que años más tarde Stella y colaboradores caracterizaron en cerebro de rata (Stella et al., 1997). Ambos endocannabinoides tienen una afinidad similar por los receptores clásicos CB₁ y CB₂ (Pertwee & Ross, 2002), y están involucrados en una larga lista de procesos fisiológicos entre los que se incluyen neuroprotección, apetito, inflamación, reproducción y emociones. Más tarde se añadieron nuevos compuestos endocannabinoides: el 2-araquidonil

gliceril éter (**noladin éter**), que actúa como agonista parcial de CB₁ y posible agonista total de CB₂ (Hanus et al., 2001; Shoemaker et al., 2005); la O-araquidonoil etanolamina (**virodamina**), que actúa como antagonista de CB₁ y agonista total de CB₂ (Porter et al., 2002); y la N-araquidonil dopamina (**NADA**), un endovanilloide que actúa a través de los receptores TRPV₁ y también tiene actividad agonista de CB₁ (Huang et al., 2002) (Figura 5).

Además, existen otros lípidos derivados de ácidos grasos y relacionados estructuralmente con AEA y 2-AG, que presentan una actividad similar a la de los endocannabinoides y que en algunos casos se ha visto que también pueden interaccionar con receptores cannabinoides. Es el caso de las N-aciletanolaminas (NAEs): N-palmitoil etanolamina (**PEA**) y N-oleiletanolamina (**OEA**) (Figura 5).

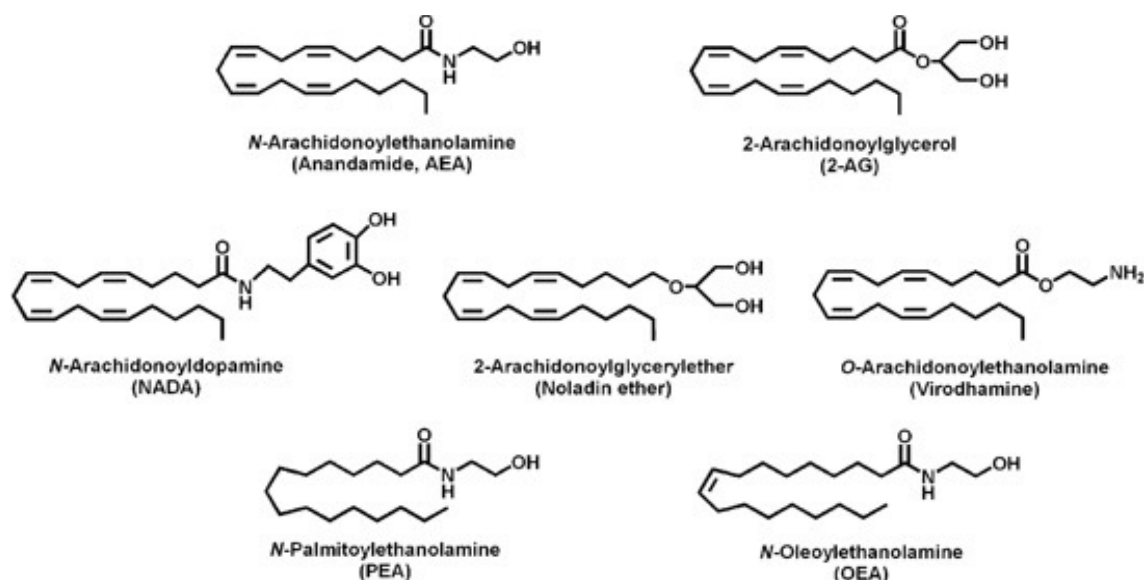


Figura 5. Estructura química de los principales endocannabinoides y lípidos relacionados.

1.2.4.1. Anandamida

La AEA está formada por ácido araquidónico y etanolamina unidos por un enlace tipo amida. En general las concentraciones de AEA en el cerebro son muy bajas (diferentes autores han descrito en cerebro de ratas y ratones sanos rangos de 3,4-15 pmol/g y 10-15 pmol/g respectivamente; revisado en Onaivi et al., 2005), los niveles más altos se corresponden con áreas que presentan una alta densidad de receptores de cannabinoides tales con hipocampo, corteza y estriado (Felder et al., 1996), aunque existen otras áreas como el tálamo, que presentan baja densidad de receptores y altos niveles de este endocannabinoide (Felder et

al., 1996; Bisogno et al., 1999). También se ha detectado, aunque en menor proporción, presencia de AEA en tejidos periféricos como riñón, corazón, bazo e hígado (Sugiura et al., 2002).

La AEA es capaz de unirse a los receptores CB₁ y CB₂, aunque muestra mayor afinidad por los receptores CB₁ (Felder et al., 1995), comportándose como agonista completo o parcial dependiendo del tejido y de la respuesta biológica estudiada (Pacher et al., 2006). Como agonista parcial de CB₂ tiene menor eficiencia, pudiendo actuar incluso como antagonista (Gonsiorek et al., 2000). También puede actuar como ligando de otros receptores diferentes a los receptores cannabinoides, es el caso de los receptores TRPV₁ (Zygmunt et al., 1999) y PPAR_γ (Bouaboula et al., 2005).

1.2.4.2. 2-araquidonilglicerol

El 2-AG está formado por ácido araquidónico unido por enlace éster a glicerol. Es el endocannabinoide más abundante en el cerebro, unas 170 veces más abundante que la AEA (Stella et al., 1997; Sugiura et al., 1995). Su presencia es especialmente significativa en tallo cerebral, médula espinal, hipocampo y estriado, y se ha detectado en menor proporción en corteza, diencéfalo y cerebelo (Bisogno et al., 1999). También se ha detectado en tejidos periféricos como intestino, bazo y páncreas (Mechoulam et al., 1995), y más tarde se detectó en corazón, hígado y riñón (Sugiura et al., 2002). El 2-AG se comporta como agonista de los receptores CB₁ y CB₂ de manera similar a la AEA (Gonsiorek et al., 2000), y además es capaz de unirse a los receptores GPR55 (Ryberg et al., 2007) y TRPV₁ (Zygmunt et al., 2013).

1.2.5. Antagonistas

El desarrollo de moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos cannabimiméticos mediados por los receptores CB₁ o CB₂, ha supuesto una herramienta clave para el estudio farmacológico del SEC. Entre estos compuestos, cabe destacar el antagonista más potente y mejor caracterizado de CB₁ hasta la fecha, el **SR141716**, más conocido por su nombre comercial Rimonabant (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Este compuesto sintetizado en 1991 por los laboratorios Sanofi-Aventis, fue comercializado en la Unión Europea en el año 2006 como adyuvante de la dieta para el tratamiento de pacientes obesos. Sin embargo, en el año 2009, la Agencia Europea del Medicamento recomendó la suspensión de su comercialización por el riesgo de estar asociado a trastornos psiquiátricos graves, incluyendo intento de suicidio. A partir de este compuesto,

se han desarrollado otros antagonistas selectivos del receptor CB₁ como el AM-251 y AM-281 (Gatley et al., 1996; Gatley et al., 1998).

Respecto al receptor CB₂, el antagonista más potente y mejor caracterizado es el **SR141528** (Rinaldi-Carmona et al., 1998), que fue sintetizado en 1995. Otros antagonistas selectivos del receptor CB₂ son AM630 y JTE907 (Ross et al., 1999; Lambert & Fowler, 2005).

Un hecho que cabe destacar, es la capacidad de estos antagonistas para provocar efectos contrarios a los evocados por los agonistas cannabinoides. Este hecho puede atribuirse a un bloqueo del tono endógeno, aunque también es posible que se comporten como agonistas inversos en determinadas situaciones, reduciendo la actividad constitutiva de los receptores cannabinoides. En concreto, este agonismo inverso se ha visto reflejado en distintos trabajos (Bouaboula et al., 1997; Pertwee, 2005; Rock et al., 2013).

1.2.6. Síntesis y degradación de los endocannabinoides

Los cannabinoides endógenos mejor caracterizados y estudiados hasta la fecha son la AEA y el 2-AG. Ambos cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor, ya que son sintetizados y liberados en las neuronas, para después unirse a receptores de membrana y finalmente ser degradados enzimáticamente en el interior celular. Sin embargo, a diferencia de los neurotransmisores no son almacenados en vesículas, si no que son liberados inmediatamente después de su síntesis. Otra diferencia respecto a los neurotransmisores clásicos, es que son sintetizados bajo demanda tras el desencadenamiento de un potencial de acción, (Di Marzo et al., 1994) y pueden actuar de forma autocrina o paracrina (Piomelli et al., 2000).

Una característica particular de estos endocannabinoides, es que en lugar del modelo clásico de neurotransmisión, donde la despolarización de la neurona presináptica produce la liberación de neurotransmisores que producen a su vez un cambio en el potencial de acción de la neurona postsináptica, también pueden actuar como mensajeros retrógrados, es decir, que como consecuencia de determinados estímulos, se pueden liberar desde las neuronas postsinápticas, siendo capaces de estimular receptores cannabinoides situados a nivel presináptico (Wilson et al., 2001). A través de esta actuación como mensajeros retrógrados, los endocannabinoides pueden modular la actividad de ciertos neurotransmisores.

Cuadro 1. Fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos

Los ligandos cannabinoides también incluyen los compuestos naturales procedentes de la planta *C.sativa* (fitocannabinoides) y los análogos sintéticos (cannabinoides sintéticos).

Los fitocannabinoides más relevantes son: **Δ^9 -THC**, responsable de las propiedades psicoactivas de la planta y agonista parcial de CB₁ y CB₂. El cannabidiol (**CBD**), principal constituyente no psicoactivo de la planta, con propiedades antioxidantes y baja afinidad por los receptores CB₁ y CB₂. Y por último el cannabinol (**CBN**), también con propiedades psicoactivas, pero una décima parte de las descritas para Δ^9 -THC (Munro et al., 1993).

Los cannabinoides sintéticos comprenden una gran variedad de compuestos que se pueden agrupar de acuerdo con su estructura en cuatro categorías (Howlett et al., 2002). Los cannabinoides sintéticos **clásicos** presentan una alta afinidad por los receptores CB₁ y CB₂, los más relevantes son: HU-210, nabilona (comercializado como Cesamet) y dronabinol (comercializado como Marinol). Dentro de los cannabinoides sintéticos **no clásicos** encontramos a CP-55940, agonista de ambos receptores. Una tercera categoría englobaría a los **aminoalquilindoles** cuya estructura

química difiere bastante de los anteriores y su principal representante es WIN-55212-2, que actúa como agonista de ambos receptores. Por último encontramos a los **eicosanoides**, derivados del ácido araquidónico, siendo la metanadamida el más destacado.

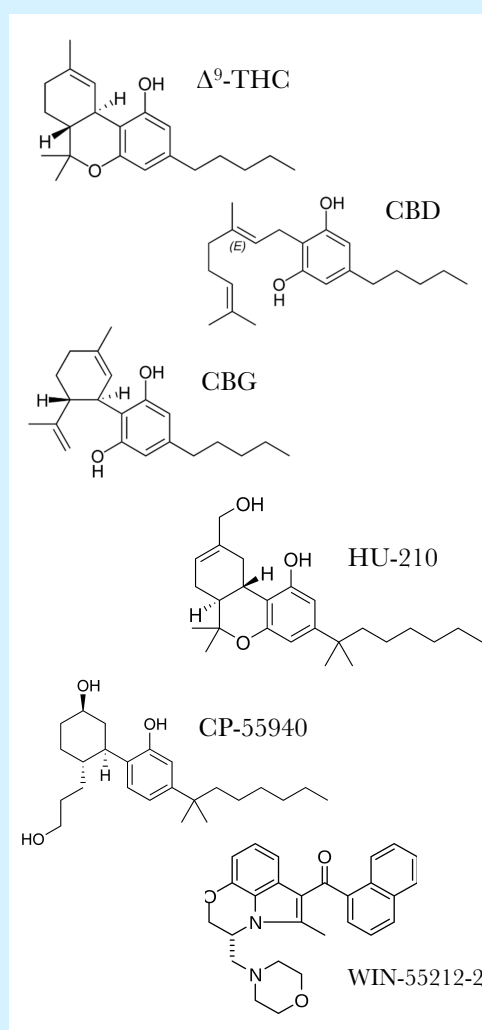


Figura 6. Estructura química de los principales fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos

1.2.6.1. Síntesis y degradación de AEA

La síntesis de AEA se produce en dos pasos sucesivos, en primer lugar la enzima N-acetiltransferasa (NAT) cataliza la formación del precursor fosfolipídico N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NAPE) y en segundo lugar, este precursor es hidrolizado por la fosfolipasa D (PLD), que libera ácido fosfatídico y AEA (Di Marzo et al., 1994). La liberación de AEA es dependiente de Ca^{2+} y se produce tras la despolarización neuronal (Cadas et al., 1996). Tras su liberación y finalización de su acción, la AEA tiene una vida media muy corta, y es rápidamente recaptada por un transportador de alta afinidad, presente tanto en neuronas como en células gliales (Beltramo et al., 1997). Se han sintetizado diferentes sustancias con capacidad para inhibir la recaptación, entre las que cabe destacar el AM404 (Beltramo et al., 1997). Tras su recaptación, ya una vez dentro de la célula, la enzima responsable de su degradación es la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*), que cataliza su hidrólisis dando lugar a su dos componentes fundamentales: el ácido araquidónico y la etanolamina (Cravatt et al., 1996; Di Marzo et al., 1998) (Figura 7).

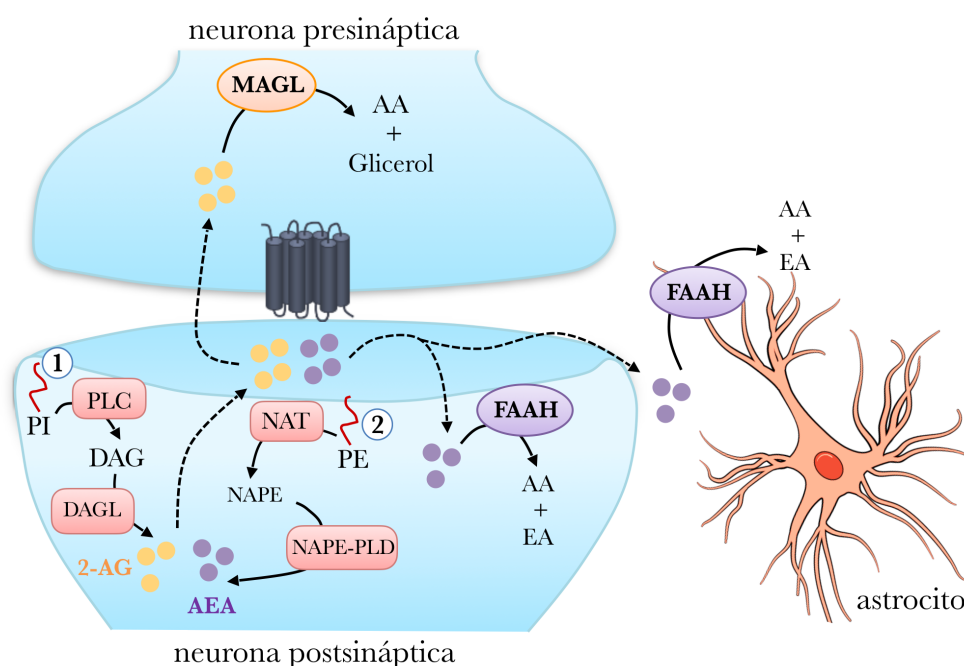


Figura 7. Esquema de las vías de síntesis y degradación de AEA y 2-AG en SNC. (1) La síntesis de 2-AG comienza con la acción de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la hidrólisis de fosfoinosítidos (PI), generando DAG. Este es hidrolizado por la enzima DAGL, liberándose el 2-AG, que posteriormente será degradado por la enzima MAGL. (2) La síntesis de AEA comienza con la actuación de la NAT, que produce la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina (PE) a NAPE. Este precursor generado es hidrolizado por la PLD, produciendo AEA, que posteriormente será degradada por la enzima FAAH.

Se han sintetizado diferentes compuestos con capacidad para inhibir la enzima FAAH, los más destacados son URB597 y AM3506 (Kathuria et al., 2003; Godlewski et al., 2010) (Figura 8).

1.2.6.2. Síntesis y degradación del 2-AG

La síntesis de 2-AG se produce por la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL), que actúa sobre el DAG y lo convierte en 2-AG (Stella et al., 1997). Su liberación, al igual que la AEA, está mediada por el aumento de Ca^{2+} intracelular que se produce durante la despolarización neuronal, vía canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Tras su liberación, y una vez cumplida su función, es recaptado por el transportador de la AEA (Piomelli et al., 1999) y posteriormente degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) a ácido araquidónico (AA) y glicerol (Stella et al., 1997) (Figura 7).

El desarrollo de inhibidores de MAGL no está tan desarrollado como en el caso de la enzima FAAH, y la mayoría son poco selectivos o tienen baja potencia. Los más destacados son JZL184 y KML29 (Long et al., 2009; Ignatowska-Jankowska et al., 2014) (Figura 8).

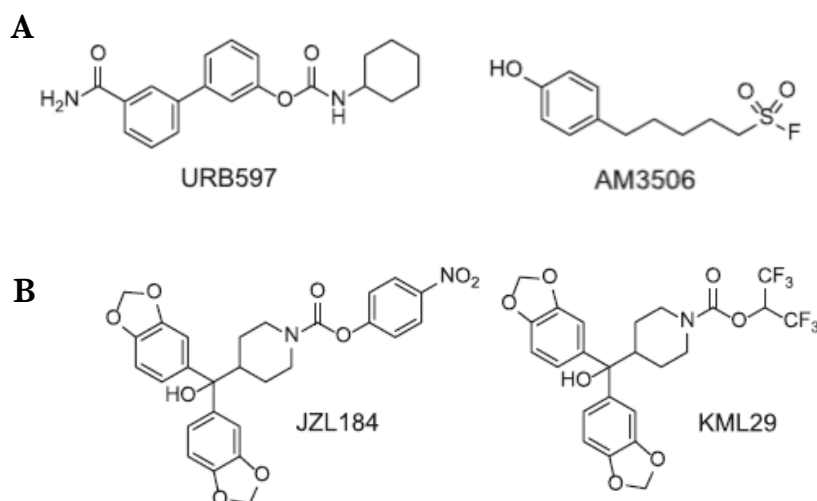


Figura 8. Estructura de los principales inhibidores de FAAH (A) y MAGL (B). (A) El desarrollo de URB597 (Kathuria et al., 2003) ha permitido obtener grandes avances en la investigación del papel de FAAH *in vivo*. Es el miembro más destacado dentro de la familia de los carbamatos, y se caracteriza por ser un potente inhibidor irreversible y muy selectivo. En roedores, este compuesto es capaz de elevar los niveles de AEA y otras NAEs sin alterar los niveles de 2-AG (Kathuria et al., 2003; Fegley et al., 2005; Gobbi et al., 2005), ya que no muestra afinidad por la enzima MAGL. (B) Los inhibidores de MAGL no son tan selectivos y pueden inhibir otras enzimas como la FAAH. Con la nueva generación de inhibidores, se ha desarrollado una mayor potencia y selectividad hacia MAGL, como es el caso del inhibidor KML29.

1.2.7. Papel fisiológico del SEC

La función principal del SEC es la regulación homeostática del cuerpo. El espectro de acciones fisiológicas es bastante amplio, y podríamos destacar su papel regulador en los siguientes sistemas esenciales: sistema neurotransmisor, sistema cardiovascular, sistema inmune, sistema endocrino, así como a nivel del metabolismo energético.

De forma resumida, los principales procesos fisiológicos en los que participa el SEC a nivel de SNC se detallan en la Tabla 1. Dado el importante papel que juega el SEC en la fisiología del ser humano, en los últimos años, se han propuesto multitud de posibles aplicaciones terapéuticas, algunas totalmente contrastadas y ya aprobadas para su uso en clínica, y otras a la espera de evidencias clínicas definitivas (ambas se detallan también en la Tabla 1).

Es importante destacar que la mayoría de los efectos evocados por los agonistas cannabinoides en el SNC, ya sean ligandos exógenos o endógenos, están asociados principalmente al estímulo del receptor CB₁.

Proceso	Función	Utilidad terapéutica actual o futura	Referencias
Actividad motora	Acciones sobre el tono muscular y la coordinación motora	Tratamiento de la espasticidad asociada a pacientes con esclerosis múltiple, Huntington o lesiones medulares	Howlett et al., 2002; Fernández-Ruiz et al., 2002
Nocicepción	Actividad analgésica	Dolor neuropático asociado a esclerosis múltiple o dolor oncológico y dolor postoperatorio	Cravatt & Lichtman, 2004; Walker & Huang, 2002)
Control de ingesta y apetito	Regulación de la ingesta y del metabolismo energético	Combatir caquexia en pacientes con SIDA o cáncer terminal	Di Marzo & Matias, 2005
Emesis	Modulación del reflejo de la náusea y el vómito	Prevención de náuseas y vómitos asociados a las quimioterapias, o a los tratamientos con retrovirales en pacientes con SIDA	Darmani et al., 2001; Van Sickle et al., 2001

Proceso	Función	Utilidad terapéutica actual o futura	Referencias
Motivación y adicción	Modificaciones del estado de ánimo, modulación de la motivación y efecto en las propiedades adictivas de las principales drogas de abuso	Posible tratamiento de alteraciones tales como ansiedad, depresiones o adicciones	Martin et al., 2002; Maldonado et al., 2006; Viveros et al., 2005
Neuroprotección	Modulación de la respuesta inflamatoria, regulación de la homeostasis del calcio y actividad antioxidante	Posible tratamiento en enfermedades tales como Parkinson, Alzheimer, Huntington, Hipoxia-Isquemia etc.	Mechoulam et al., 2002a; Croxford, 2003
Aprendizaje y memoria	Alteración de los procesos de memoria	Posible tratamiento para prevenir alteraciones cognitivas y mejora de la amnesia en la EA	Riedel & Davies, 2005; Sullivan, 2000
Proliferación celular	Inhibición del crecimiento de ciertos tumores	Posible tratamiento antitumoral	Guzmán, 2003; Velasco et al., 2007

Tabla1. Principales procesos fisiopatológicos en los que participa el SEC a nivel de SNC.

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1. Aspectos generales

La EA es un trastorno neurodegenerativo asociado a la edad y es asimismo la causa más común de demencia entre los ancianos, representando entre un 50-75% de todos los casos de demencia (Tabla 2).

La demencia consiste en la pérdida de la función cerebral, normalmente de naturaleza crónica o progresiva, que ocurre a causa de ciertas enfermedades y en la cual hay una alteración de múltiples funciones incluyendo la memoria, el pensamiento, el juicio y el comportamiento. En la actualidad se estima que, a nivel mundial, más de 46 millones de personas viven con demencia, y diversos estudios epidemiológicos indican que este número se duplicará para el año 2030 y triplicará para el 2050 según el informe anual sobre Alzheimer 2015 (Prince et al., 2015). Estas cifras constituyen un motivo de preocupación, ya que contribuyen a la carga mundial de enfermedades no transmisibles y es por ello

que la Organización Mundial de la Salud ha reconocido la demencia como una prioridad de salud pública (WHO, 2012).

Subtipo de demencia	Sintomatología	Neuropatología	Proporción de casos de demencia
Enfermedad de Alzheimer	Pérdida de memoria, dificultad en el lenguaje, deterioro de las habilidades visoespaciales y depresión	Placas neuríticas y ovillos neurofibrilares	50-75%
Demencia vascular	Los déficits cognitivos dependen de la localización de los infartos. Alteraciones prominentes del comportamiento	Enfermedad cerebrovascular. Multiinfartos o infartos estratégicos	20-30%
Demencia frontotemporal	Alteraciones del comportamiento, desinhibición y dificultad en el lenguaje	Atrofia en los lóbulos frontales y/o temporales	5-10%
Demencia con cuerpos de Lewy	Alucinaciones visuales y parkinsonismo	Cuerpos de Lewy (alfa-sinucleína)	<5%

Tabla 2. Principales subtipos de demencia. La cuatro subtipos más comunes en orden de frecuencia son: enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal y demencia con cuerpos de Lewy (Prince et al, 2015).

En el caso de la EA, la edad es el principal factor de riesgo. Según diferentes estimaciones, entre el 2% y 10% de todos los casos de demencia comienzan antes de los 65 años (Figura 9), y la prevalencia se duplica con cada intervalo de 5 años después de los 65 años de edad (Rossor et al., 1996; Hebert et al., 2013). Se estima que para el 2050, dos mil millones de personas serán mayores de 60 años en todo el mundo (World Population Ageing, 2009), por ello, la EA aparece como uno de los mayores problemas de salud actuales con un creciente impacto socio-económico en las próximas décadas. El coste total de la demencia en todo el mundo asciende en la actualidad a 818.000 millones de dólares estadounidenses y engloba tanto las cargas económicas directas (atención médica y social), como indirectas (cuidados no remunerados por familiares y amigos) (Prince et al, 2015).

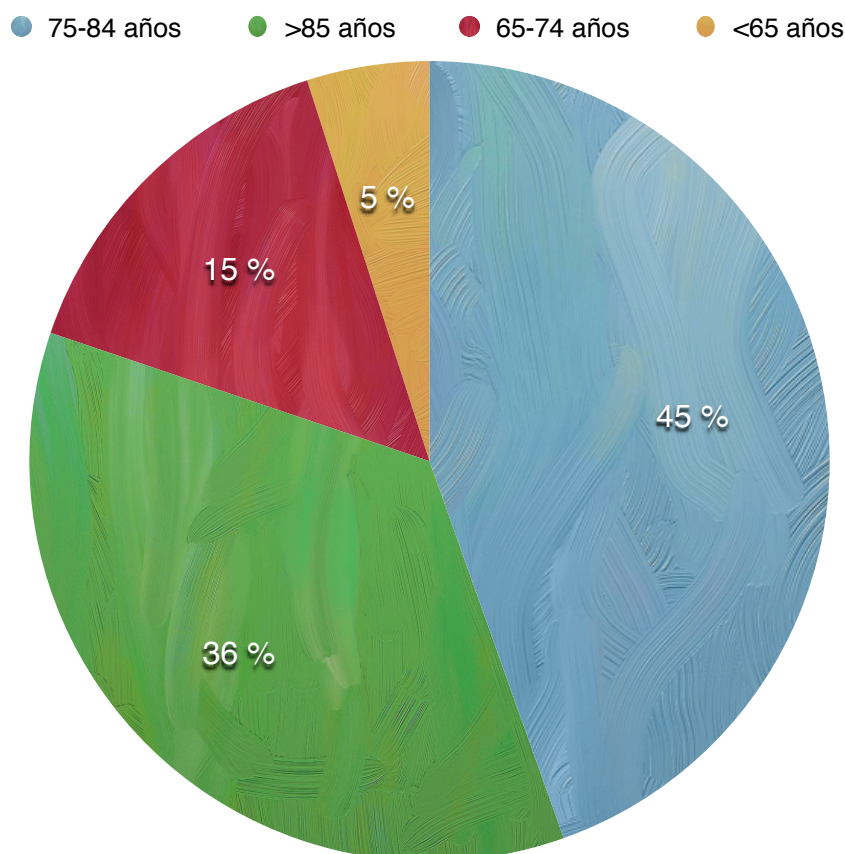


Figura 9. Porcentajes de personas con EA según la edad. EE.UU. 2015

En la actualidad se estima que 5,3 millones de americanos de todas las edades padecen EA, de los cuales alrededor de 5,1 millones son personas mayores de 65 años y unas 200.000 padecen Alzheimer antes de los 65 (Hebert et al., 2013; Alzheimer's Association, 2006).

2.2. Características clínicas

2.2.1. Sintomatología

El inicio de la enfermedad es gradual y a medida que la enfermedad avanza los problemas se vuelven más evidentes y limitantes. Los síntomas comúnmente experimentados son: pérdida de la memoria, desorientación, cambios en el estado de ánimo y el comportamiento, dificultad en el habla y la comprensión etc. Según va evolucionando la enfermedad, se van comprometiendo más funciones cognitivas, hasta alcanzar una incapacidad total por controlar las funciones básicas del cuerpo (Selkoe, 1997). El curso de la enfermedad es insidioso y se estima que algunos pacientes con EA pueden sobrevivir hasta 20 años después de ser diagnosticados, aunque la supervivencia suele oscilar entre los 3 y 9 años en función de que el diagnóstico de la enfermedad se produzca alrededor de los 65 años o bien superados los 90 años (Fitzpatrick et al., 2005).

2.2.2. Neuropatología

El curso de la EA está muy relacionado con los cambios neuropatológicos que ocurren en el cerebro de estos pacientes. Estos cambios se caracterizan fundamentalmente por el deterioro de la neurotransmisión en diferentes áreas del SNC, debido a la formación de las denominadas **placas neuríticas o seniles**, consistentes en acumulaciones extraneuronales de la proteína β -amiloide ($A\beta$), y a la aparición de **ovillos neurofibrilares** (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*) en el citoplasmas de las neuronas, compuestos principalmente de la proteína tau hiperfosforilada (Dickson, 1997). Ambas lesiones histopatológicas constituyen los dos elementos distintivos de la enfermedad y conllevan la pérdida progresiva de neuronas y sinapsis, además de desencadenar otros procesos, como la neuroinflamación y el estrés oxidativo, que contribuyen a la neurodegeneración (Giulian, 1999; Wyss-Coray & Mucke, 2002). Las áreas principalmente afectadas son el hipocampo, subículo, amígdala y áreas de asociación neocorticales.

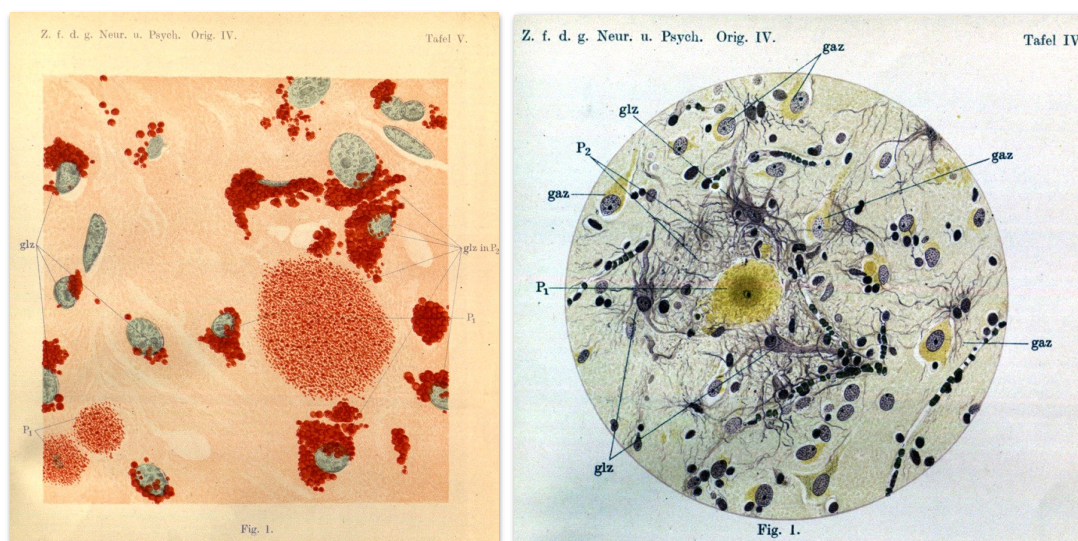


Figura 10. Ilustraciones originales de Alois Alzheimer mostrando placas seniles y su interacción con células gliales reactivas. Alzheimer describía las placas seniles (P1, P2) como “grandes acúmulos de gránulos lipoides”, y representaba las células gliales (glz) rodeando las placas, y muy cercanas a las neuronas (gaz) (Alzheimer, 1911).

Estos signos neuropatológicos característicos de la enfermedad, fueron descritos por primera vez en 1906, por el psiquiatra y neurólogo alemán Dr Alois Alzheimer, quien los identificó por primera vez al analizar el cerebro *post-mortem* de una mujer de 51 años (Auguste Deter) con pérdida de memoria, alucinaciones y desorientación (Graeber et al., 1997; Maurer et al., 1997). El Dr Alois

Alzheimer presentó este caso en una comunicación en la en la 37^a Reunión de psiquiatras del sudoeste de Alemania, bajo el título “Sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral”. En esta conferencia, el Dr Alzheimer presentó sus hallazgos, entre los que cabe destacar la marcada disminución del tamaño de la corteza cerebral, (lo que hoy conocemos como atrofia cortical), la presencia de numerosos depósitos de distintas formas y tamaño (las denominadas placas seniles) (Figura 10), y la acumulación de fibrillas modificadas desconocidas (conocidas como NFTs) (Figura 11) (Alzheimer, 1907).

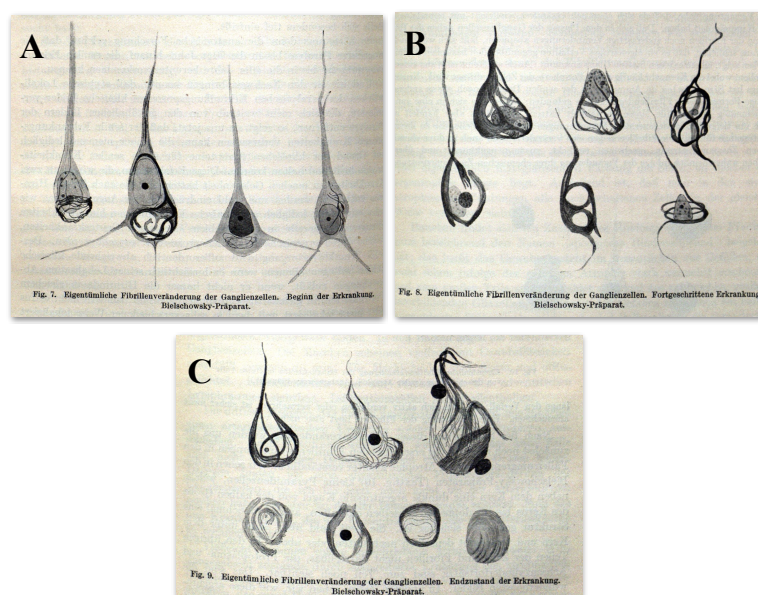


Figura 11. Ilustraciones de Alois Alzheimer mostrando los cambios fibrilares producidos en las neuronas según la progresión de la enfermedad. Según él mismo lo describe, con el avance de la enfermedad “el citoplasma va encogiéndose, y van apareciendo fibrillas que finalmente desintegran el núcleo, hasta que solo queda un ovillo neurofibrilar que indica el lugar donde previamente ha existido una neurona” (Alzheimer, 1911). (A) Fase temprana, (B) Fase media y (C) Fase avanzada.

Perusini, uno de los colaboradores más cercanos de Alzheimer, también analizó y estudió el cerebro de Auguste Deter, y publicó sus datos en 1910, donde detalló las características neuropatológicas encontradas (Figura 12) (Perusini, 1910).

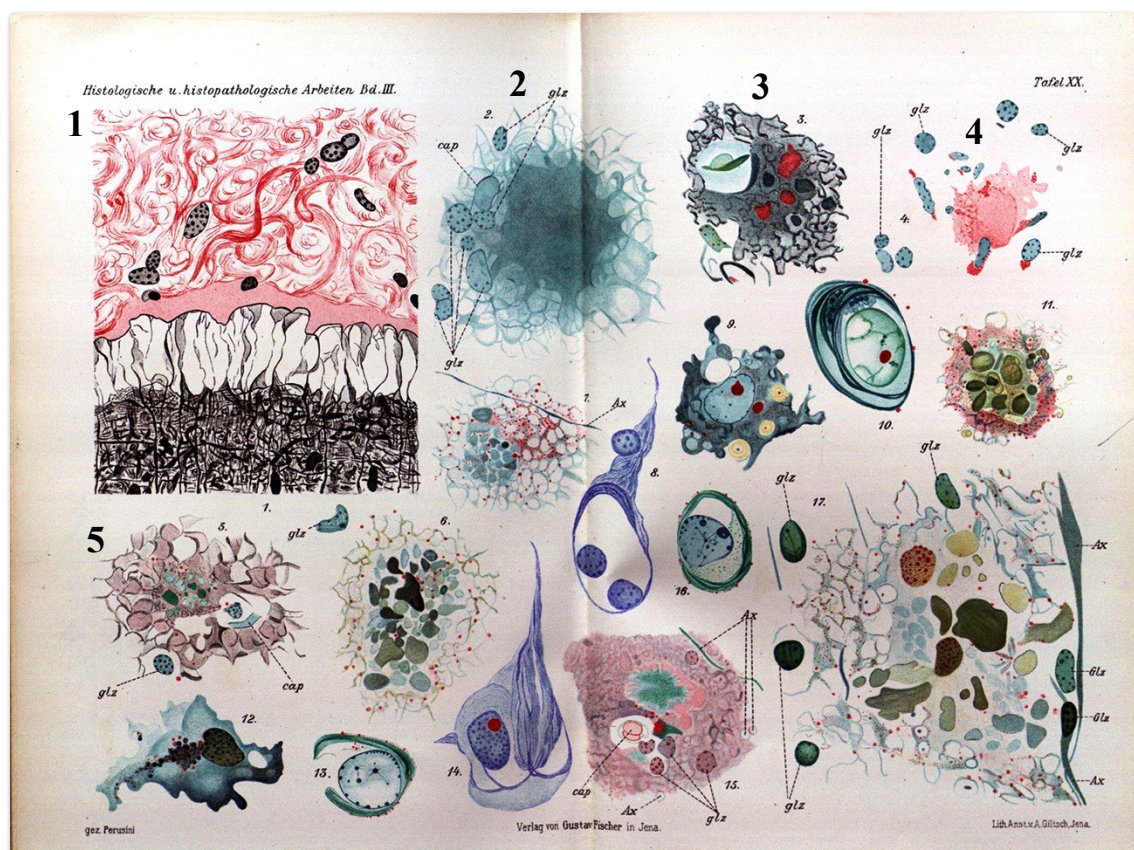


Figura 12. Ilustraciones de Gaetano Perusini. Los dibujos de 1 a 5 muestran las placas en el cerebro de Auguste. El uso de diferentes colores se debe a las distintas técnicas de tinción aplicadas (Perusini, 1910).

2.3. Principales proteínas implicadas en el desarrollo de la EA

2.3.1. Proteína tau

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, del inglés *microtubule associated proteins*) y se encuentra principalmente en los axones. Sus principales funciones consisten en promover el ensamblaje y estabilizar los microtúbulos (Dixit et al., 2008), por lo que resulta fundamental para la morfogénesis y el transporte axonal (Johnson & Hartigan, 1999). En condiciones normales la proteína tau se fosforila en diversos sitios a lo largo de la molécula y se sabe que la fosforilación regula negativamente su habilidad para unirse a los microtúbulos, es decir, cuando se fosforila reduce su afinidad por ellos, lo que permite la inestabilidad dinámica requerida para los rápidos movimientos mitóticos de las células. Sin embargo, en condiciones patológicas, cuando se hiperfosforila, se produce la despolimerización de los microtúbulos y la

proteína tau al ser insoluble tiende a agregarse formando los NFTs característicos de la EA (Figura 13). Como consecuencia de esto, la neurona no puede transmitir señales eléctricas ni transportar nutrientes y se produce la degeneración y muerte neuronal. En el proceso de fosforilación de tau intervienen un grupo de quinasas, principalmente la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3, del inglés *glycogen synthase kinase 3*), la proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5, del inglés *cyclin-dependent kinase 5*) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) (Hanger et al., 1992; Baumann et al., 1993; Drewes et al., 1992).

La distribución de los NFTs durante el desarrollo de la enfermedad sigue un patrón determinado que se correlaciona con el grado de demencia (Braak & Braak, 1991). Así, en las fases más tempranas, se localizan en la corteza entorrinal y transentorrinal y la región CA1 del hipocampo y en las fases más avanzadas de la enfermedad en áreas neocorticales, tálamo y amígdala (Braak & Braak, 1991).

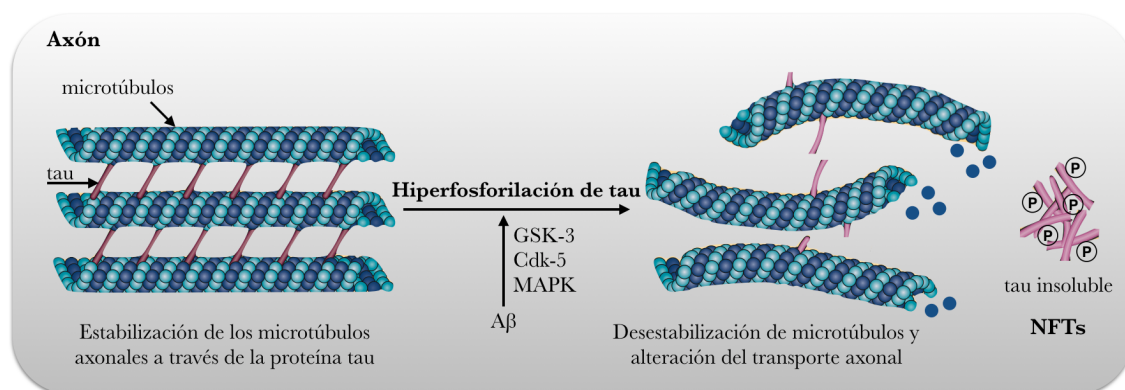


Figura 13. Efecto de la hiperfosforilación de tau. En la EA se produce una hiperfosforilación anómala de la proteína tau que conduce a la formación de NFTs y a la disfunción neuronal. Varias quinasas están involucradas en este proceso, como por ejemplo GSK-3, Cdk-5 y MAPK. Otros factores como el péptido Aβ pueden favorecer la formación de NFTs.

2.3.2. Proteína Precursora Amiloide (APP)

La APP (del inglés, *β-amyloid precursor protein*) es una glicoproteína integral de membrana de tipo I que consta de un gran dominio extracelular amino terminal y un pequeño dominio intracelular carboxilo terminal (Selkoe, 1991). Se expresa en numerosas células y tejidos del organismo, incluidas las neuronas y las células gliales.

Hasta el momento su función fisiológica no está del todo clara, pero se piensa que puede estar implicada en la migración y diferenciación neuronal, estimulación del crecimiento de neuritas, adhesión celular, plasticidad sináptica, y supervivencia celular (Roch et al., 1994; Mattson, 1997; Hoe & Rebeck, 2008). La APP está codificada por un gen localizado en el cromosoma 21. Se han identificado múltiples mutaciones en el gen de APP que causan EA familiar. Estas mutaciones consisten en sustituciones de aminoácidos dentro o cerca del dominio A β (Thinakaran & Koo, 2008).

2.3.2.1. Procesamiento de la APP

Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la APP pasa por el aparato de Golgi donde se glicosila y empaqueta en vesículas de transporte, después atraviesa el citoplasma y, por último, se inserta en la membrana celular. Allí será procesada por medio de secretasas (*alfa*, *beta* y *gamma*-secretasas), siguiendo dos posibles rutas: **amiloidogénica y no amiloidogénica** (Figura 14).

La ruta no amiloidogénica comienza con la acción de una proteasa conocida como α -secretasa, de manera que se genera un fragmento extracelular soluble (sAPP α) que se libera al espacio extracelular, y un fragmento de 83 aminoácidos que queda integrado en la membrana (C83). Este último es procesado por la γ -secretasa, un complejo formado por cuatro subunidades, entre ellas las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), que libera un fragmento corto denominado P3. Esta vía previene la formación de la forma patológica del péptido amiloide, con lo que se impide la formación de las placas seniles (Hardy & Higgins, 1992; Haass et al., 2012).

La ruta conocida como amiloidogénica, comienza con la proteólisis mediada por la β -secretasa o BACE (del inglés, *beta-site APP cleaving enzyme*), que genera un fragmento carboxilo terminal más largo (C99), y libera un fragmento extracelular, también soluble, 16 aminoácidos más corto que sAPP α , denominado sAPP β . Tras la acción de BACE, el fragmento integrado en la membrana es procesado por la γ -secretasa, liberándose un péptido insoluble que tiende a formar agregados y constituye el componente mayoritario de las placas seniles. El péptido A β es de longitud variable dependiendo del corte de la enzima (39-43 aminoácidos), siendo A β_{42} la forma más propensa a la agregación y la más neurotóxica (Hardy & Higgins, 1992; Haass et al., 2012).

La distribución del péptido A β (en forma de placas seniles) es más extensa que la de NFTs, siendo las áreas más afectadas el hipocampo, la corteza y el tálamo. No obstante, no se ha encontrado relación entre el número de placas y el deterioro cognitivo.

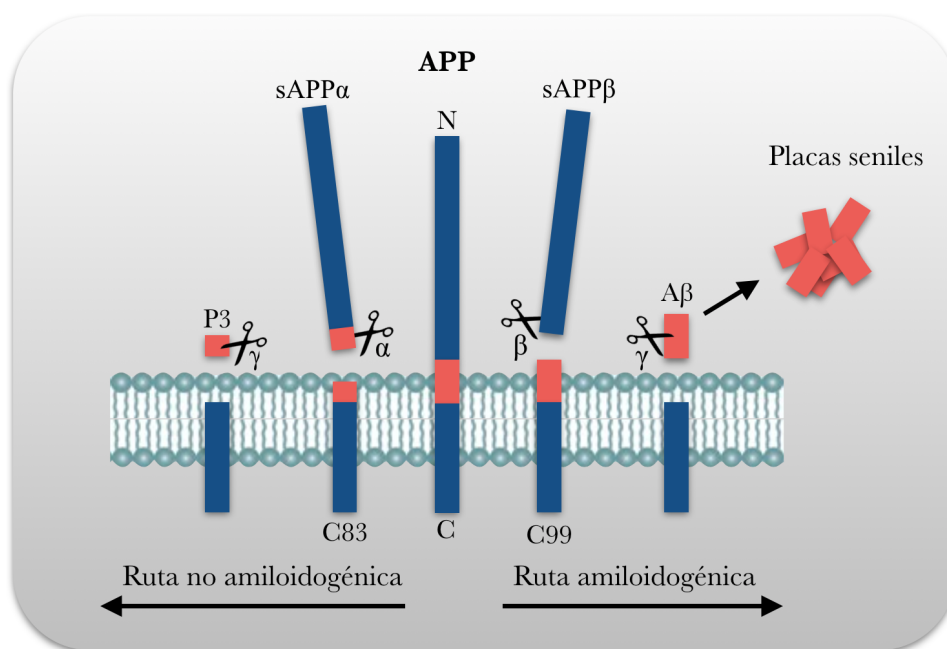


Figura 14. Procesamiento de la APP en neuronas. En una situación fisiológica siguiendo la vía no amiloidogénica, la APP es catabolizada por la α -secretasa, produciendo un fragmento sAPP α que permanece en el espacio extracelular, y un fragmento carboxilo terminal que queda anclado en la membrana plasmática, este último es procesado por la γ -secretasa dando lugar a un péptido soluble denominado P3. Sin embargo, en una situación neuropatológica la APP se metaboliza por la ruta amiloidogénica, en la que la β -secretasa procesa la APP, quedando un fragmento integrado en la membrana que será procesado por la γ -secretasa, dando lugar al A β insoluble que formará las placas seniles características de la enfermedad.

Los depósitos extracelulares de A β presentan una gran diversidad morfológica y pueden clasificarse en placas neuríticas y placas difusas. Las placas difusas presentan predominantemente la forma no fibrilar, normalmente carecen de glía asociada y no suelen presentar neuritas distróficas, ni daño neuronal (Dickson & Vickers, 2001), por lo que se asocian con un envejecimiento normal y no se consideran tóxicas. Por el contrario, las placas neuríticas presentan una estructura fibrilar y están formadas principalmente por A β_{42} y A β_{40} , las células de microglía aparecen asociadas y también presentan neuritas distróficas (Serrano-Pozo et al., 2011).

2.3.2.2. Formas oligoméricas de A β

Como se mencionaba anteriormente, una de las principales características de la EA es la formación de placas seniles compuestas por fibras insolubles de A β que se depositan extracelularmente. Sin embargo, no hay una correlación clara entre el número de placas y el deterioro cognitivo (Nelson et al., 2009). Esta discrepancia ha promovido que se realicen multitud de estudios sobre otras formas oligoméricas responsables de la neurotoxicidad. En concreto estudios recientes han descrito la existencia de formas oligoméricas solubles tóxicas, capaces de difundir por el parénquima cerebral, provocando toxicidad neuronal y deterioro cognitivo, además de activar la microglía y los astrocitos (Hardy & Selkoe, 2002; Haass & Selkoe, 2007).

Las moléculas de A β pueden presentar distintos grados de agregación, formando desde secuencias de bajo peso molecular formadas por una unidad (monómeros) hasta oligómeros, formados entre 2 y 24 unidades. Actualmente se cree que las formas oligoméricas solubles son las causantes de los daños más tempranos de la EA y parecen estar implicados en los daños neuronales y las disfunciones sinápticas (Haass & Selkoe, 2007).

2.3.2.3. Angiopatía amiloide

En la mayoría de casos de EA, los depósitos de amiloide se encuentran también en la pared de vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos, y se da generalmente en las fases más avanzadas de la enfermedad (Hachinski & Muñoz, 1997; Jiang et al., 2008). El grado de angiopatía amiloide no se correlaciona ni con el grado de placas y ovillos, ni con el grado de deterioro cognitivo.

2.3.2.4. Hipótesis cascada amiloide

Esta hipótesis sugiere que el proceso neurodegenerativo observado en los cerebros con EA, vendría dado principalmente como consecuencia de los eventos citotóxicos desencadenados por la formación, agregación y depósito del péptido A β (Hardy & Selkoe, 2002), y la aparición de NFTs sería un fenómeno secundario que aparecería como respuesta a la aparición de depósitos amiloides. Varios estudios sugieren que el péptido A β generado en la ruta amiloidogénica, puede acelerar la hiperfosforilación de tau, favoreciendo la generación de NFTs (Zheng et al., 2002; Oddo et al., 2003; Bloom, 2014) y corroborando así la hipótesis de la cascada amiloide. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que las mutaciones implicadas en la EA familiar, se encuentran en los genes que

codifican el sustrato (APP) y las enzimas (PS1 y PS2), claves para la generación del A β (este apartado se desarrolla en el punto 2.5.6).

Se están investigando nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas dirigidas a la modulación de las enzimas encargadas del procesamiento anómalo de la APP. Varios trabajos muestran que la actividad y los niveles de BACE están incrementados en los cerebros de personas afectadas por la EA (Fukumoto et al., 2002; Yang et al., 2003; Sadleir & Vassar, 2012), de ahí su gran interés como diana terapéutica para tratar la enfermedad; sin embargo esto supone todo un reto, ya que esta enzima además de la APP, tiene muchos más sustratos, lo que hace que su inhibición pueda dar lugar a efectos adversos (Vassar & Kandalepas, 2011). Además el inhibidor debe ser una molécula grande e hidrófila, presentando dificultades para atravesar la barrera hematoencefálica. En cuanto a los inhibidores de la γ -secretasa, presentan problemas similares a los de los inhibidores de BACE (Imbimbo & Giardina, 2011), debido a que esta enzima interviene en el procesamiento de otras proteínas entre las que se encuentra Notch, cuya inhibición daría lugar a efectos adversos. Por ello, se están utilizando moduladores selectivos que bloquean la γ -secretasa, alterando únicamente el procesamiento de la APP sin interferir en otras vías. Por último, otra de las estrategias terapéuticas va dirigida a la activación de la α -secretasa, de esta forma se disminuiría la formación de A β insoluble y se favorecería la producción de sAPP α , al cual se le han demostrado propiedades neuroprotectoras. Actualmente se están investigando varios compuestos activadores de la ruta no amiloidogénica, pero hay muy pocos en fase de ensayos clínicos. En la Tabla 3 se muestran los diversos ensayos en fase clínica, enfocados en la búsqueda de un tratamiento contra la EA y basados en la modulación de las vías enzimáticas implicadas en el procesamiento de la APP.

Fármaco	Mecanismo de acción	Fase ensayo clínico	Compañía farmacéutica
LY2886721	Inhibidor de BACE	Fase II completada	Eli Lilly
MK-8931		Reclutando pacientes para fase II/III	Merck Sharp & Dohme Corp.
E2609		Reclutando pacientes para fase II	Eisai Inc.
AZD3293 (LY3314814)		Reclutando pacientes para fase II/III	AstraZeneca & Eli Lilly
Semagacestat	Inhibidor de γ -secretasa	Fase III completada	Eli Lilly
Avagacestat		Fase II completada	Bristol-Myers Squibb
5074 CHF		Fase II completada	Chiesi Pharmaceuticals Inc.
Briostatina	Activador de α -secretasa	Fase II completada	Neurotrope Bioscience
Acitretina		Reclutando pacientes para fase II	Johannes Gutenberg University Mainz
EGCg		Fase I/II completadas	Charite University, Berlin, Germany
Etazolato		Fase III completada	Exonhit

Tabla 3. Ensayos clínicos basados en la inhibición/activación de las proteasas implicadas en el procesamiento de la APP (www.clinicaltrials.gov, 2016).

2.4. Neuroinflamación en la patogénesis de la EA

La neuroinflamación es una característica clave que comparten muchas enfermedades neurodegenerativas. En particular, en la EA, continúa siendo una incógnita si la neuroinflamación es causa o consecuencia de la patología. Hasta ahora la opinión más aceptada, era que la respuesta inflamatoria surge como consecuencia de la deposición amiloide, agravando así la progresión de la enfermedad, sin embargo, existen nuevas evidencias que sugieren que la inflamación tiene un papel causal en la patogénesis de la enfermedad (Hensley,

2010; Heneka et al., 2015). No obstante, aunque los análisis de ciertos marcadores inflamatorios resultan muy prometedores, aún no han sido validados para su uso de forma clínica. De ser así, estos análisis proporcionarían una señal fácilmente detectable de la patología en sus fases más iniciales (Craig-Schapiro et al., 2010; Antonell et al., 2014).

Por otro lado, ha quedado demostrado en numerosos estudios, que la deposición de amiloide genera un proceso de inflamación crónica denominado gliosis reactiva, en el que se ven involucrados las células de microglía y los astrocitos, así como el sistema del complemento y diferentes enzimas y proteínas proinflamatorias. En los siguientes apartados veremos el papel de la glía, específicamente microglía y astrocitos, en la fisiopatología de la EA.

2.4.1. Microglía

La microglía es una célula con capacidad fagocítica, de origen hematopoyético que reside en el SNC (Kim & De Vellis, 2005). Constituye entre un 10-15% del total de la población celular cerebral, y se encuentra distribuida por todo el parénquima cerebral, tanto en áreas de sustancia blanca como en sustancia gris, aunque la densidad no es la misma en todas las regiones del SNC (Lawson et al., 1990). Morfológicamente, se caracteriza por tener un soma muy pequeño y numerosas ramificaciones denominadas procesos celulares. Esta microglía ramificada denominada microglía quiescente (Figura 15 A), es característica de la microglía en estado de reposo. En dichas condiciones, su principal función consiste en rastrear el medio con el fin de detectar cualquier cambio en el entorno, y poder así reaccionar rápidamente. Estudios *in vivo* con ratones que expresan la proteína fluorescente verde en las células de microglía, han demostrado que la microglía es altamente dinámica y que sus procesos celulares se encuentran continuamente en movimiento, estableciendo contactos con otras células del SNC (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al, 2005).

Tras una lesión o una situación patológica del SNC, se produce la activación microglial. Este proceso conlleva unos cambios morfológicos, inmunofenotípicos y funcionales (Mosher & Wyss-Coray, 2014) (Tabla 4), dando lugar a una célula redondeada y sin prolongaciones conocida como microglía ameboide (Figura 15 B y C) (Streit et al., 1999), cuya principal función será migrar hacia la zona de lesión para reparar el daño. Posteriormente se induce la expresión de ciertos marcadores de superficie como CD11b, CD11c, CD14, CD68, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility*

complex), receptores de quimioquinas y citoquinas, y receptores tipo toll (TLR, del inglés *toll-like receptors*) que van a activar la respuesta inmune.

Esta activación microglial también va a llevar asociada la liberación de sustancias citotóxicas como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y óxido nítrico (NO) (Bianca et al., 1999; Klegeris et al., 1994), y además, se va a iniciar una cascada proinflamatoria que resulta en la liberación de una gran variedad de citoquinas, quimioquinas, proteínas del complemento y proteasas, que promueven la excitotoxicidad e inducen a la neurodegeneración (Suzumura, 2009).

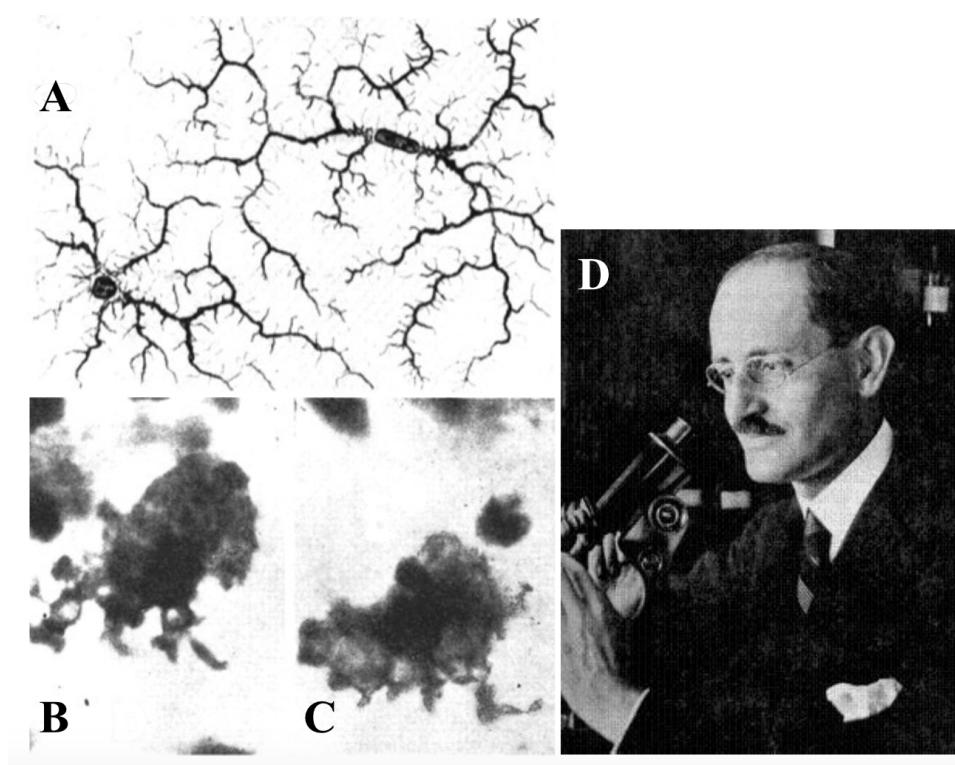


Figura 15. Proceso de activación microglial y cambios morfológicos asociados. La transformación de células microgliales ramificadas (A) en ameboides (B, C) fue descrita por el discípulo de Cajal, Del Río Hortega (D) en 1919, y ha sido corroborada ampliamente por observaciones posteriores (Del Río-Hortega, 1919; Del Río-Hortega, 1932).

Funciones	Cerebro sano	Cerebro con EA	Referencias
Proliferación	La microglía adulta conserva su capacidad proliferativa	La proliferación microglial se ve incrementada	Lawson et al., 1992 Bondolfi et al., 2002 Kamphuis et al, 2012
Motilidad y migración	Los procesos microgliales son altamente dinámicos	La motilidad se ve deteriorada lo que sugiere una menor vigilancia inmune en el cerebro.El péptido A β puede estimular la quimiotaxis microglial	Rogers & Lue, 2001 Nimmerjahn et al., 2005 Ryu et al., 2009 McLarnon et al., 2012 Orre et al., 2014 Koenigsknecht-Talboo et al., 2008
Comunicación intercelular	La microglía muestra un papel beneficioso y está involucrada en la recepción y propagación de las señales inflamatorias. La expresión de proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias son apenas evidentes	El inmunofenotipo característico de la microglía reactiva es: MHC-II, CD11b/CR3, CD68 y TLR, con una expresión más localizada de estos marcadores, alrededor de los depósitos de amiloide más densos y compactos. Además, la microglía va a liberar una amplia gama de mediadores inflamatorios exacerbando el daño celular	Rogers et al., 1988 Arends et al., 2000 Strohmeier et al, 2002 Landreth & Reed-Geaghan, 2009 Cameron & Landreth, 2010
Proteostasis	Se mantiene una correcta homeostasis proteica, asegurando que no se acumule ninguna forma aberrante de proteína	Se producen alteraciones que dan lugar a la acumulación de agregados de amiloide. Aunque la microglía es capaz de fagocitar el A β , aún no está claro si es capaz de degradar la proteína, y sin la posterior degradación la microglía es incapaz de fagocitar más A β	Taylor & Dillin, 2011 Prokop et al., 2013

Funciones	Cerebro sano	Cerebro con EA	Referencias
Fagocitosis	La microglía tiene la capacidad de fagocitar y restaurar el parénquima dañado	La habilidad de la microglía por reconocer y captar el A β está ampliamente respaldada por la presencia de múltiples receptores que le permiten unirse al él (como los receptores para productos de glicación avanzada, TLR, CD14, receptores “scavenger”...). La retirada de A β es más eficiente en fases tempranas de la enfermedad que en las tardías, donde la capacidad fagocítica se ve deteriorada por la falta de detección del amiloide y el retraso en la migración al lugar del daño	Yan et al., 1996 Liu et al., 2005 Hickman et al., 2008 Solito & Sastre, 2012 Liu et al., 2012 Krabbe et al., 2013 Michaud et al., 2013

Tabla 4. Diferencias funcionales de la microglía en un cerebro sano y un cerebro con EA.

Por último, cabe destacar que la liberación de ciertos transmisores químicos, como el ATP (adenosín trifosfato), también promueven la activación microglial. La liberación de ATP se ve inducida por diversos estímulos, entre ellos, los impulsos eléctricos y la lisis celular. Una vez liberado, va a ejercer su acción a través de los receptores purinérgicos P₂X (metabotrópicos) y P₂Y (ionotrópicos) presentes en las células gliales (Burnstock & Kennedy, 1985; Dubyak & el-Moatassim, 1993), y va a inducir tanto la activación microglial como la astrogial. En concreto, en las células de microglía va a estimular la quimiotaxis y la producción de citoquinas (Davalos et al., 2005; Dou et al., 2012). Además, en respuesta a una lesión, el aumento de ATP extracelular va a ejercer un importante papel en la modulación del calcio intracelular, a través de receptores purinérgicos localizados en astrocitos. De esta manera, se provoca un incremento del calcio intracelular que se va a propagar directamente de astrocito a astrocito (Guthrie et al., 1999), lo cual va a favorecer la liberación de más ATP, generándose cascadas de señalización que se consideran claves en la propagación de la respuesta a la lesión entre las células de la glía (Verderio & Matteoli 2001).

2.4.2. Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundante del SNC, constituyendo un 90% del total de la población celular cerebral. Según su morfología y distribución se han identificado dos tipos de astrocitos: fibrosos y protoplasmáticos (Haycock & Bro, 1975). Los astrocitos protoplasmáticos se localizan principalmente en la sustancia gris, y poseen un núcleo redondeado con un cuerpo celular del que parten prolongaciones gruesas, cortas y muy ramificadas (Figura 16 B). Los astrocitos fibrosos se localizan sobre todo en la sustancia blanca y presentan prolongaciones más largas y no muy ramificadas (Figura 16 C). En ambos casos, esas prolongaciones se extienden hacia las neuronas y hacia los láminas basales que rodean a los capilares sanguíneos. A través de estudios estructurales, se ha detectado la presencia de filamentos intermedios específicos que se extienden por el soma y las prolongaciones, constituidos por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acid protein*). Esta proteína está implicada en el mantenimiento de la estructura, el movimiento y la comunicación celular, y además, su presencia ha permitido la identificación de las células astrogiales mediante técnicas de inmunohistoquímica (Pekny & Pekna, 2004).

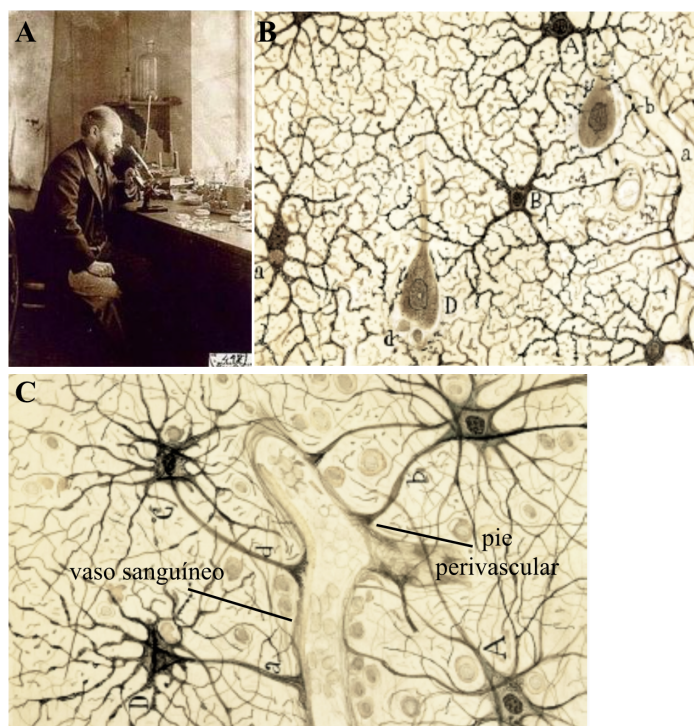


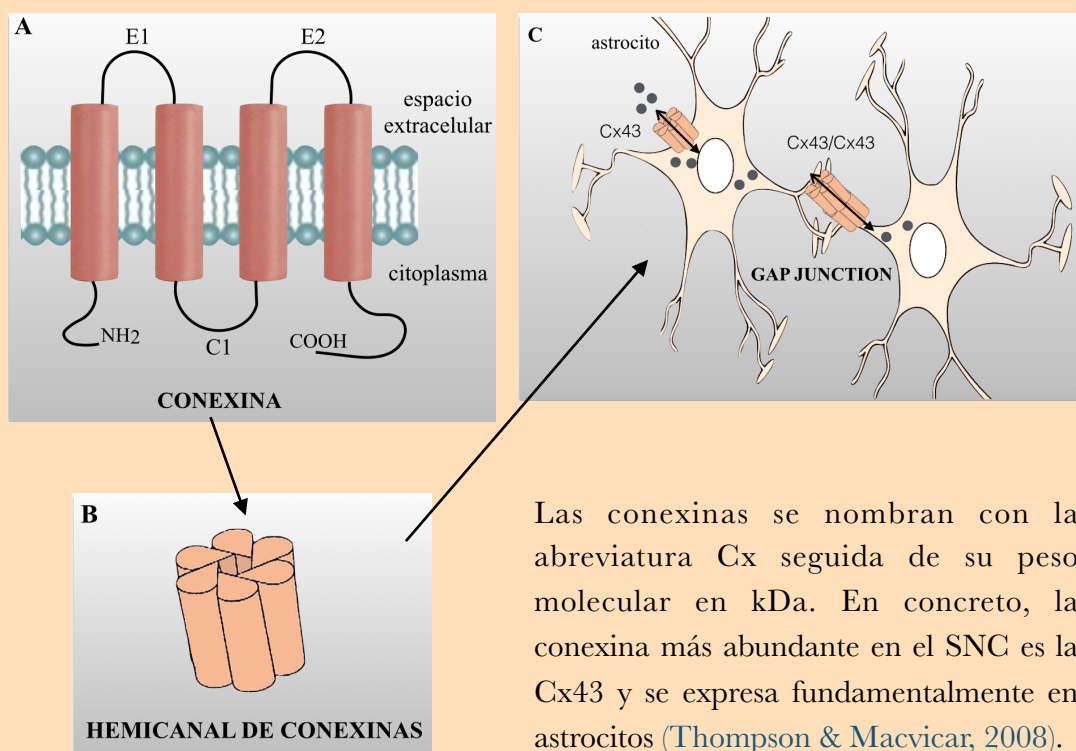
Figura 16. Tipos morfológicos de astrocitos. Dibujos realizados por Cajal (A) para ilustrar los astrocitos protoplasmáticos (B) situados en la sustancia gris, con prolongaciones más cortas y muy ramificadas; y los astrocitos fibrosos (C) de la sustancia blanca, con prolongaciones muy finas y largas pero menos ramificadas. En ambos casos, se detallan los pies perivascuales terminales que se extienden hasta situarse alrededor de vasos sanguíneos y neuronas para cumplir su función de aporte de nutrientes a las células nerviosas (Cajal, 1913).

Cuadro 2. Hemicanales y *gap junctions*

Las conexinas son una familia de proteínas que se agrupan formando un anillo hexamérico denominado hemicanal, permitiendo así la comunicación con el medio extracelular (Orellana et al., 2009). Cada conexina consta de 4 dominios transmembrana, dos bucles extracelulares (E1 y E2), y uno citosólico (C1) que da lugar a una localización citoplasmática de los extremos terminales amino y carboxilo (NH₂ y COOH) (A y B). Diversos estudios han demostrado que estas estructuras permiten el intercambio de ciertas moléculas con el medio extracelular, entre ellas: aminoácidos, glucosa, iones, ATP y NAD⁺ (Schalper et al., 2010), así como la captación de marcadores impermeables a la membrana, como el Lucifer Yellow o el BrEt, ampliamente usados para estudiar la actividad hemicanal astrocitaria (Contreras et al., 2002).

La unión de dos hemicanales en células adyacentes va a dar lugar a la formación de unos canales intercelulares conocidos como *gap junctions* (C), cuya función es establecer puentes de comunicación entre las células. La difusión de las distintas moléculas a través de estos canales suele ser bidireccional y está controlada por gradientes electroquímicos.

Este flujo de moléculas puede ser inhibido por la existencia de drogas bloqueantes tanto de *gap junctions* como de hemicanales (octanol, gap 26, heptanol, carbenoxolona y ácido flufenámico entre otros), lo cual constituye una gran herramienta para estudiar su mecanismo (Sáez et al., 2003).



Las conexinas se nombran con la abreviatura Cx seguida de su peso molecular en kDa. En concreto, la conexina más abundante en el SNC es la Cx43 y se expresa fundamentalmente en astrocitos (Thompson & Macvicar, 2008).

Se han descrito numerosas funciones para los astrocitos, algunas de las más importantes son:

- **Modulación de los niveles de glutamato:** El glutamato está considerado como el principal neurotransmisor excitador en el SNC. Altas concentraciones extracelulares de este neurotransmisor producen una sobrestimulación de las neuronas, provocando excitotoxicidad que puede llevar a su muerte. Los astrocitos son capaces de recaptar el glutamato liberado al espacio intersináptico mediante transportadores específicos presentes en su membrana, terminando así su función neurotransmisora y evitando la sobrestimulación neuronal (Anderson & Swanson, 2000).
- **Soporte metabólico y energético a neuronas:** Los astrocitos establecen contacto con los vasos sanguíneos y las neuronas. De esta forma, pueden acceder a la glucosa de los vasos y proveer metabólicamente a las neuronas. Además son capaces de almacenar glucógeno como fuente de energía (Brown & Ransom, 2007; Suh et al., 2007).
- **Mantenimiento de los gradientes iónicos (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) y la homeostasis:** Los astrocitos disponen de canales que permiten recaptar específicamente estos iones (Obara et al., 2008), y trasladarlos a zonas donde su concentración es menor, o directamente al torrente sanguíneo (Araque et al., 2001; Simard & Nedergaard, 2004). Debido a la generación de impulsos nerviosos entre neuronas, se produce una entrada masiva de Na^+ en el interior de la neurona y un gran aumento de K^+ en el medio extracelular. El K^+ es recaptado rápidamente por la célula glial, impidiendo así su acumulación y daño neuronal. De este modo, el astrocito realiza la homeostasis del medio extracelular, y restaura las condiciones iónicas iniciales mediante las bombas iónicas de la membrana (ATPasas Na^+/K^+).
- **Soporte trófico a neuronas:** La astroglia secreta, bajo condiciones normales, una gran variedad de factores tróficos (factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$, del inglés *tumor necrosis factor*), factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF } \beta$, del inglés *transforming growth factor*) etc que influyen en la supervivencia y plasticidad neuronal (Ridet et al., 1997; Araque & Navarrete, 2010). Particularmente después de una lesión, se ve

incrementada la liberación de estos factores, capaces de modular el proceso de neurogénesis (Schwartz & Nishiyama, 1994)

- Red de comunicaciones entre células gliales y neuronas: Los astrocitos van a formar una red de comunicación esencial a través de los hemicanales y los canales hendidura más conocidos como *gap junctions* (Cuadro 2).

La activación astrogliar, al igual que la microglial, también induce la liberación de citoquinas, interleuquinas, NO, y otras moléculas potencialmente tóxicas, exacerbando aún más la respuesta inflamatoria.

2.4.3. Mediadores inflamatorios

El papel de la inflamación en la patología de la EA ha sido estudiado en profundidad (Akiyama et al., 2000; Shastri et al., 2013). En estadios iniciales la inflamación tiene un papel neuroprotector, ya que constituye un mecanismo de defensa que va a reparar el área dañada. Sin embargo, si el estímulo activador persiste, la incapacidad por resolver ese daño resulta en una respuesta inflamatoria crónica (Streit et al., 2004), donde microglía y astrocitos se hacen citotóxicos, potenciando aún más la neurodegeneración (Sastre et al., 2006). Por tanto, la inflamación puede tener resultados beneficiosos o perjudiciales, principalmente dependiendo de la duración del proceso inflamatorio.

En este contexto, las terapias con AINEs han sido consideradas para el tratamiento de la enfermedad (Szekely et al., 2004). Sin embargo, los resultados publicados hasta la fecha son inconsistentes y requieren más ensayos clínicos. A pesar de que los resultados que hay hasta la fecha son contradictorios, la mayoría de estudios epidemiológicos sugieren que el uso prolongado de AINEs podría retardar el inicio de la enfermedad, lo que sugiere que este tipo de terapias podrían ser útiles si se iniciasen antes de la aparición de los síntomas neurológicos.

2.4.3.1. Citoquinas

Las citoquinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular sintetizadas por diferentes tipos celulares, entre ellos las células de microglía y los astrocitos. Se producen como respuesta ante una reacción inflamatoria, o cualquier tipo de lesión o estrés. Su función principal es la inmunorregulación, siendo fundamentales a la hora de dirigir la respuesta inmune innata y específica. Las citoquinas pueden ser proinflamatorias y antiinflamatorias, el mantenimiento de un correcto balance en la producción de los distintos tipos de citoquinas, juega un

papel crítico en la neuroinflamación generada en la EA, ya que una disregulación en este equilibrio puede inducir a una sobreactivación celular y a un aumento de la citotoxicidad (Swardfager et al., 2010; Azizi & Mirshafiey, 2012). Las principales citoquinas proinflamatorias que actúan en el proceso de inflamación son: interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6) y TNF α . Las principales citoquinas antiinflamatorias encargadas de limitar el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria son: interleuquinas 4 y 10 (IL-4 e IL-10), el antagonista del receptor de la IL-1 y TGF β .

2.4.3.2. Quimioquinas

Las quimioquinas son un tipo de citoquinas, generalmente de menor peso molecular. Se denominan así debido a su capacidad por inducir la quimiotaxis, por lo que desempeñan un papel importante en los procesos de inflamación del SNC, en la comunicación celular y en el reclutamiento de células inflamatorias (Luster, 1998). En particular, estas moléculas pueden inducir la migración microglial y astrocitaria en el área de neuroinflamación provocada por los depósitos de amiloide, y son por tanto, responsables de la extensión de la inflamación local.

2.4.3.3. Óxido Nítrico

El NO es un gas simple muy reactivo sintetizado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*), enzima involucrada en procesos fisiológicos como la comunicación neuronal, la defensa del huésped y la regulación de la presión arterial. iNOS se ha implicado en fenómenos de citotoxicidad que tienen lugar en numerosas neuropatologías (como la EA, Parkinson o Huntington), debido a las elevadas concentraciones tóxicas de NO que libera en su actividad (Moncada et al., 1991; Gross & Wolin, 1995). El NO puede reaccionar con otras especies oxidativas como el anión superóxido ($-O_2$), formando peroxinitrito (ONOO $-$). El aumento excesivo del peroxinitrito va a causar estrés oxidativo, dañando la estructura de las células, y alterando por tanto su funcionalidad (Pacher et al., 2007), principalmente de las neuronas, las cuales son especialmente sensibles a este proceso (Mattson, 1998).

2.4.3.4. Especies reactivas de oxígeno

Son un conjunto de moléculas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos

de óxido-reducción. Un aumento en la producción de ROS origina un estado de estrés oxidativo en la célula. Además de provocar daños celulares, el estrés oxidativo influye en la regulación de ciertos genes involucrados en la aceleración de los procesos de envejecimiento, en la activación de rutas de apoptosis y en la activación de distintas respuestas de defensa frente al este estrés oxidativo. En múltiples desórdenes neurodegenerativos, como la EA, existe un desequilibrio en la generación de ROS y diversos autores sugieren que este hecho podría estar involucrado en su patogénesis (Benzi & Moretti, 1995).

2.4.3.5 Ciclooxygenasa

La COX o prostaglandina-endoperoxidase sintasa es un enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas (COX-1 y COX-2). La COX-2 se expresa en neuronas excitatorias y su expresión está regulada por una variedad de estímulos como mediadores inflamatorios o mitógenos (Smith & Marnett, 1991). En concreto, en diversas patologías como la EA está sobreactivada (Pasinetti, 1998), y es capaz de producir niveles de prostaglandinas bastante superiores a los producidos por COX-1, las cuales son responsables de muchos de los efectos citotóxicos que llevan a las neuronas a la muerte celular (Seibert et al., 1995). Es por ello que las prostaglandinas se han vuelto importantes dianas farmacológicas en el tratamiento con AINEs, para prevenir la EA.

2.5. Factores de riesgo

A excepción de algunos casos de Alzheimer causados por mutaciones genéticas, los expertos creen que la enfermedad se desarrolla debido al resultado de múltiples factores y no a una única causa. A lo largo de los años, se han estudiado los distintos factores biológicos, medioambientales, sociales y culturales que pueden estar asociados con la EA. En los siguientes apartados se describen los principales factores de riesgo asociados con la enfermedad.

2.5.1. Edad

Es el principal marcador de riesgo de la enfermedad, de tal forma que la prevalencia se duplica cada 5 años después de los 65 años de edad (Rossor et al., 1996; Hebert et al., 2013). Este incremento exponencial es similar a lo largo de distintos estudios y es independiente de la región geográfica. Las personas de menos de 65 años también pueden desarrollar EA, pero con una prevalencia mucho menor (ver Figura 10).

2.5.2. Sexo

Se dan estimaciones de prevalencia de EA mayores entre las mujeres que entre los hombres (2:1), aunque probablemente esto pueda deberse más a una mayor expectativa de vida que a factores específicos relacionados con el sexo (Hebert et al., 2001).

2.5.3. Educación

Existen distintas publicaciones en las que se sugiere un incremento de EA en poblaciones con menor nivel académico (Stern et al., 1994; Launer et al., 1999; Gatz et al., 2001; Sando et al., 2008). La mayoría de estudios sugieren que las personas con menor nivel educativo tienen mayor riesgo de sufrir Alzheimer que aquellas que recibieron un nivel educativo más alto. Los mecanismos biológicos implicados en esta beneficiosa asociación pueden ser varios y aún están por explicar, por eso, estos hallazgos deben interpretarse con cautela, ya que existe la posibilidad de que haya factores no medidos que sean responsables de esta asociación.

2.5.4. Hipertensión

Existen evidencias consistentes que asocian la hipertensión en edad media-avanzada y la demencia (Skoog et al., 1996; Freitag et al., 2006; Power et al., 2011), sobre todo la demencia de tipo vascular. Además de las alteraciones vasculares causadas por la hipertensión, también se ha observado atrofia cerebral en individuos hipertensos (Strassburger et al., 1997; Den Heijer et al., 2005). Sin embargo, la asociación de la hipertensión en edad media-avanzada con EA todavía no se ha demostrado de forma convincente.

2.5.5. Diabetes

Numerosos artículos han demostrado la asociación de la diabetes con la EA (Curb et al., 1999; Peila et al., 2002; MacKnight et al., 2002; Akomolafe et al., 2006). Existen varios posibles mecanismos por los cuales la diabetes puede incrementar el riesgo de padecer Alzheimer. El *link* más plausible entre diabetes y EA parece ser la formación de productos de glicación avanzada (PGA). Los PGA son proteínas modificadas que se forman en situaciones de hiperglucemia o alto estrés oxidativo (Yao & Brownlee, 2010), y tanto en diabetes como en cerebros con EA, los niveles de PGA se encuentran elevados. En el caso de la patología

amiloide, los PGA parecen estimular la producción del A β e inducir la hiperfosforilación de tau (Li et al., 2012).

2.5.6. Factores genéticos

Podríamos clasificar las mutaciones genéticas en dos tipos: mutaciones en genes determinantes y mutaciones en genes de susceptibilidad.

Genes de susceptibilidad: Su presencia aumenta el riesgo de padecer EA. Destacan las mutaciones en el gen de la apolipoproteína E (APOE). Esta proteína está implicada en el transporte y eliminación del colesterol y en humanos existen tres isoformas distintas (E2, E3 y E4) que difieren entre sí únicamente en un aminoácido. La isoforma más común es la ApoE3, con una frecuencia del 60% en la población americana, la ApoE4 es menos frecuente, aproximadamente un 20-30%, y la menos frecuente es la ApoE2 (10-20%) (Raber et al., 2004). La posesión del alelo ϵ 4, especialmente en homocigosis, es un gran factor de riesgo para el desarrollo de EA. Los individuos con una copia del alelo ϵ 4, tienen tres veces más riesgo de desarrollar Alzheimer que aquellos sin este alelo, mientras que los individuos que hereden dos copias del alelo ϵ 4, tienen entre 8 y 12 veces más riesgo de desarrollar EA (Holtzman et al., 2012; Loy et al., 2014).

Varios estudios estiman que entre un 40 y 65% de las personas diagnosticadas con EA tienen una o dos copias del alelo ϵ 4 (Saunders et al., 1993; Farrer et al., 1997; Alzheimer's Disease Education and Referral Center, 2011). Sin embargo, los individuos portadores de la isoforma ApoE4, no necesariamente tienen que desarrollar la enfermedad, es decir, no es necesario ni suficiente para causar la enfermedad.

Aunque el mecanismo por el cual ApoE está implicado en la EA no está del todo claro, se sugiere que al menos algunos de los efectos patológicos de ApoE pueden estar mediados por interacciones con la cascada de A β , de hecho se ha descrito en pacientes con EA y portadores de ApoE4, un aumento en los niveles de A β , y la presencia de ApoE en las placas neuríticas (Schmechel et al., 1993).

Genes determinantes: Son muy poco frecuentes (1%) y por tanto, responsables de muy pocos casos (Bekris et al., 2010). Se trata de mutaciones en genes de transmisión autosómica dominante con penetrancia completa, por lo que su presencia determina inexorablemente la aparición de la EA, conocida en este caso como EA familiar. Las mutaciones afectan al gen que codifica la APP (en el cromosoma 21), y a los genes que codifican las presenilinas 1 y 2 (en los

cromosomas 14 y 1 respectivamente). Los individuos con mutaciones en alguno de los tres genes, desarrollan los síntomas de la enfermedad a edades muy tempranas, antes de los 65, y puede presentarse entre gente más joven, sobre los 30 años de edad.

2.6. Diagnóstico

Han pasado más de 100 años desde que la enfermedad se identificara por primera vez, y aunque se han hecho grandes avances en la investigación, aún queda mucho por descubrir sobre los cambios biológicos que causan Alzheimer y resulta crucial la detección temprana, y encontrar nuevos tratamientos para reducir el riesgo o retrasar el comienzo de la enfermedad.

El diagnóstico de la EA no resulta tarea fácil y conlleva la realización de múltiples pruebas:

- Evaluación del historial familiar del paciente. Se tendrán en cuenta sobre todo los historiales psiquiátricos y los cambios cognitivos y de conducta.
- Examen neuropsicológico. Existen una serie de guías o criterios a seguir, denominados DMS-5 (del inglés, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), que ayudan a determinar si el paciente sufre algún tipo de demencia.
- Evaluación de la memoria y las habilidades cognitivas.
- Estudios de neuroimagen. Mediante resonancia magnética se analizan las medidas volumétricas del cerebro, apreciándose una marcada atrofia cerebral en pacientes con Alzheimer respecto a los controles sanos. Y mediante la tomografía por emisión de positrones se puede analizar el descenso en el metabolismo de la glucosa (medido por fluorodesoxyglucosa) en aquellas zonas cerebrales con alteraciones funcionales.
- Biomarcadores. A través del líquido cefalorraquídeo se ven reflejados los cambios patológicos que ocurren en el Sistema Nervioso Central (SNC). En la EA se ven incrementados los niveles de la proteína tau, y reducidos los del A β (Nägga et al., 2002; Sunderland et al., 2003). La ausencia simultánea de estos dos biomarcadores permite descartar a las personas que no tienen Alzheimer, pero su presencia no permite diagnosticar esta patología con certeza.
- Análisis histopatológicos. A pesar de la multitud de pruebas, ninguna de las anteriores supone una prueba definitiva que pueda confirmar la enfermedad, por tanto, el diagnóstico definitivo de la EA se realiza *post-mortem*, tras el

análisis neuropatológico del tejido cerebral y la detección de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el mismo.

Como podemos ver, en la actualidad el diagnóstico de la enfermedad, no es de certeza sino de probable Alzheimer.

2.7. Tratamientos actuales

Aunque actualmente no existen tratamientos disponibles para retrasar o detener el daño cerebral que provoca la EA, se encuentran disponibles algunos tratamientos que pueden aminorar los síntomas o disminuir su progreso. A día de hoy existen 5 medicamentos aprobados por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*).

Son muchos los factores que contribuyen a dificultar el desarrollo de fármacos para tratar la EA, entre ellos se incluyen: el alto coste que implica el desarrollo de fármacos, la falta de un diagnóstico temprano, el estudio con fármacos en fases muy avanzadas de la enfermedad y el obstáculo que supone para los fármacos atravesar la barrera hematoencefálica. Los fármacos desarrollados hasta ahora para tratar los síntomas de la EA podrían dividirse en dos tipos: los inhibidores de la colinesterasa y los agentes glutamatérgicos

Inhibidores de colinesterasa: Son recetados para tratar las etapas de media a moderada. Mantienen los niveles altos de acetilcolina, mejorando la transmisión colinérgica que se ve deteriorada en esta enfermedad, mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa en la hendidura sináptica y por ello, podrían incrementar ligeramente la capacidad cognitiva de los pacientes con EA (Hyde et al., 2013).

Agentes glutamatérgicos: La memantina es el único fármaco de este tipo, y fue aprobado para el tratamiento de las etapas de moderada a grave. Es un antagonista de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), de esta forma regula la actividad del glutamato, reduciendo así la excitotoxicidad y previniendo la entrada excesiva de iones calcio, lo que permite una transmisión normal de señales entre las neuronas cerebrales (Howard et al., 2012).

Los efectos secundarios de ambos tipos de fármacos pueden incluir náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de apetito, dolor de cabeza, fatiga, confusión y alucinaciones (Mielke et al., 2012).

Además, cabe mencionar, que en diferentes etapas de la EA, los pacientes pueden experimentar problemas de angustia, intranquilidad, agresividad, alucinaciones y

delirio entre otros ([American Psychiatric Association, 2004](#)). Existen dos formas de controlar estos síntomas psiquiátricos, utilizando medicamentos para controlar estos cambios en el comportamiento o estrategias sin fármacos. Los fármacos más utilizados son antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos.

3. EL SEC COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LA NEUROINFLAMACIÓN

Dado que la presente Tesis se centra en el estudio de la EA y la neuroinflamación, en los siguientes apartados abordaré el interés de los cannabinoides como posibles agentes terapéuticos en esta patología.

Como hemos visto anteriormente, el SEC juega un papel muy importante en distintos procesos cerebrales tales como la neuroprotección, la memoria y el aprendizaje, aspectos claves en la EA. A priori, podría parecer contraproducente el uso de cannabinoides para el tratamiento de la enfermedad debido a sus efectos psicoactivos y sobre la memoria. Sin embargo, existen otros aspectos de la sintomatología de la enfermedad, donde la modulación del tono endocannabinoide podría ser relevante y beneficiosa.

El papel del SEC en esta patología está ampliamente demostrado por numerosos estudios *post-mortem* de cerebros de personas afectadas por la EA. En estos estudios, se ha observado un aumento en la expresión de los receptores CB₂, mientras que la expresión CB₁ se ha visto reducida en estadios avanzados de la enfermedad ([Benito et al., 2003](#); [Ramírez et al., 2005](#); [Solas et al., 2013](#); [Manuel et al., 2014](#)). Por el contrario, en otros estudios diferentes no se han encontrado diferencias en los niveles de expresión de CB₁ ([Lee et al., 2010](#); [Ahmad et al., 2014](#)). Además en estudios recientes, los niveles de AEA se encontraron reducidos en la corteza frontal y temporal, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de 2-AG ([Jung et al., 2012](#)). En este mismo estudio se observó que los niveles de AEA estaban inversamente correlacionados con el péptido Aβ₄₂. En línea con estos estudios, se han detectado niveles elevados de FAAH (enzima responsable de la degradación de AEA) en áreas con depósitos de placas ([Benito et al., 2003](#)).

3.1. Efecto antiinflamatorio

La aparición de placas neuríticas en el parénquima cerebral desencadena una compleja reacción inflamatoria, en la que las células de la glía, en especial la microglía activada, desempeñan un papel crucial. La liberación de mediadores inflamatorios, así como la liberación masiva de radicales de oxígeno, llevan a la muerte de las neuronas produciendo neurodegeneración. Una de las estrategias terapéuticas propuestas para el tratamiento de la EA, es el uso de fármacos antiinflamatorios (Wyss-Coray, 2006).

Ciertos agonistas cannabinoides son capaces de reducir los acontecimientos inflamatorios que acompañan a distintas enfermedades neurodegenerativas, mediante la modulación de la respuesta inmune. Este efecto de los cannabinoides se ha corroborado tanto en estudios *in vitro*, como *in vivo* (Walter & Stella, 2004), y está mediado principalmente por la activación de receptores CB₂ y PPARs (Correa et al., 2005; Klein, 2005), aunque también pueden involucrar a los receptores CB₁ (De Iago et al., 2012).

Distintos estudios sugieren que tanto PEA como AEA tienen efectos neuroprotectores y antiinflamatorios (Conti et al., 2002; Correa et al., 2010; Hernangómez et al., 2012; Skaper & Facci, 2012). En concreto AEA, a través de los receptores CB₁ y CB₂ (Eljaschewitsch et al., 2006), es capaz de inducir un cambio inmunofenotípico en la microglía (Tchantchou et al., 2014) que conlleva un incremento en la expresión de citoquinas antiinflamatorias y al descenso de citoquinas proinflamatorias (Puffenberger et al., 2000; Facchinetti et al., 2003).

Además, numerosos estudios han demostrado que durante la neuroinflamación, la microglía activada sobreexpresa el receptor CB₂ (Ramirez et al., 2012; Benito et al., 2008). Aunque sabemos que las células de microglía juegan un papel crítico en la respuesta del SNC frente a estímulos dañinos, todavía desconocemos la función precisa que los receptores CB₂ pueden ejercer en estas células.

3.2. Efecto antioxidante

Otro de los procesos fundamentales en la degeneración neuronal es el estrés oxidativo debido a la producción de ROS por parte de las células de la glía. Ciertos cannabinoides pueden disminuir la concentración de radicales libres gracias a sus propiedades como agentes antioxidantes, entre ellos cabe destacar el CBD (Hampson et al., 1998; Esposito et al., 2007). Otros compuestos con propiedades antioxidantes capaces de reducir el estrés oxidativo son el Δ^9 -THC y el CBN (Marsicano et al., 2002).

3.3. Efecto antiglutamatergico

El glutamato es uno de los neurotransmisores más abundantes del SNC, que ejerce un papel clave en distintas funciones neurofisiológicas, siendo crucial en la cognición (Rammsayer, 2006). El glutamato realiza su acción excitadora a través de receptores específicos situados en la membrana neuronal. En concreto, a través de la activación de los receptores ionotrópicos NMDA ejerce un papel crucial en los procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal.

En el caso de la EA, se ha demostrado la existencia de un exceso tanto de glutamato, como de actividad glutamatérgica sobre los receptores NMDA (Masliah et al., 1998). Esta sobreactivación conlleva a una excesiva entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona, alterando la plasticidad neuronal y el aprendizaje (Danysz et al., 2000). Es por ello que se usan muchos compuestos con propiedades antagonistas sobre los receptores de glutamato como parte de las pautas de tratamiento de pacientes con EA.

Los cannabinoides han demostrado inhibir la liberación de glutamato en neuronas hipocampales a nivel presináptico, ejerciendo un potente efecto antiexcitotóxico (Shen & Thayer, 1998), pudiendo mediar un potencial efecto neuroprotector. Este efecto está mediado por los receptores CB_1 (Shen et al., 1996), y parece estar relacionado con la participación glutamatérgica en la regulación de los procesos de la memoria. Así, un antagonista de los receptores NMDA como el HU211, es capaz de reducir la entrada de Ca^{2+} al interior celular, y así proteger frente a la neurotoxicidad (Mechoulam et al., 2002a). Además, la AEA puede inhibir la neurotransmisión glutamatérgica en neuronas hipocampales actuando a nivel presináptico (Shen et al., 1996).

3.4. Neurogénesis

El SEC (receptores y enzimas de síntesis y degradación) se expresa en las dos principales áreas neurogénicas del cerebro: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular. Se ha visto en distintos estudios, que a través de los receptores CB_1 y CB_2 , se pueden regular mecanismos de proliferación y diferenciación de precursores neurales (Jiang et al., 2005; Aguado et al., 2007; Palazuelos et al., 2006; Aguado et al., 2005). Las nuevas células formadas pueden adquirir fenotipo neuronal y también en función del tipo de estímulo y el contexto celular se pueden generar células gliales.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis consistió en estudiar las consecuencias de la inhibición de FAAH en el contexto de la neuroinflamación. Para ello, hemos usado un modelo *in vivo* de neuroinflamación crónica y un modelo *in vivo* de daño agudo. Dicho estudio se realizó a través de dos diseños experimentales distintos:

Diseño experimental 1. Estudio *in vivo* de lesión aguda. Microscopía intravital

Para este estudio se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto y estandarización de ventanas craneales.
2. Desarrollo del sistema y metodología de microscopía multifotónica intravital.
3. Elucidación de los elementos que regulan la respuesta glial aguda en ratones *Wildtype* y FAAH *knock-out* a nivel molecular. Para ello se caracterizó el papel de la microglía y los astrocitos tras un daño agudo en el parénquima cerebral mediante técnicas de microscopía intravital.
4. Caracterización de la actividad hemicanal *in vivo* en ratones *Wildtype* y FAAH *knock-out*.
5. Determinación de la implicación de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂.
6. Evaluación de los efectos sobre la respuesta glial tras la aplicación de un inhibidor irreversible de FAAH, y tras la aplicación del endocannabinoide AEA.

Diseño experimental 2. Estudio *in vivo* de neuroinflamación crónica

Para este estudio se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización del impacto de la patología amiloide en el modelo de ratón 5XFAD a distintas edades (3 y 6 meses). Para ello se evaluó el perfil conductual y cognitivo, además de analizar el proceso inflamatorio a través de técnicas moleculares e histológicas.
2. Estudio del papel funcional de la enzima FAAH en el contexto de la patología amiloide. Para ello se analizaron los efectos de la inhibición de FAAH sobre las alteraciones conductuales y cognitivas y se estudiaron los posibles cambios neuroinflamatorios a través de técnicas moleculares e histológicas.
3. Estudio de la implicación de los receptores de cannabinoides CB₁ en los efectos derivados de la inactivación de FAAH
4. Evaluación los efectos del tratamiento con un inhibidor irreversible de FAAH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La estabulación y manipulación de los ratones de experimentación fue realizada en las instalaciones de la Universidad Rey Juan Carlos, en jaulas con enriquecimiento ambiental, bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad relativa (55-60%), y ciclos constantes de luz/oscuridad (12/12 horas). Durante su estabulación los animales tuvieron libre acceso al agua y a la dieta estándar.

Todos los protocolos de experimentación y procedimientos empleados se llevaron a cabo siguiendo la normativa española RD 1201/2005 y RD 53/2013, y las directrices de la normativa de la Unión Europea (86/609/EEC). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación de la Universidad Rey Juan Carlos.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones macho con fondo genético C57BL/6 con 5 genotipos distintos:

- Ratones *wild type* (WT): Los ratones C57BL/6 se usaron como controles.
- Ratones *FAAH knockout* (FAAH^{-/-}): Estos animales fueron generados y cedidos por el Dr. Benjamin Cravatt ([Cravatt et al., 2001](#)). Mediante recombinación homóloga se reemplazó el exón 1 (E1) del gen *FAAH* por el *cassette* Neo (que confiere resistencia al antibiótico neomicina) entre los sitios de inserción EcoRI y EcoRV, de esta manera la enzima FAAH permanece inactiva, proporcionando una herramienta muy útil para el estudio de la función génica *in vivo* (Figura 1).

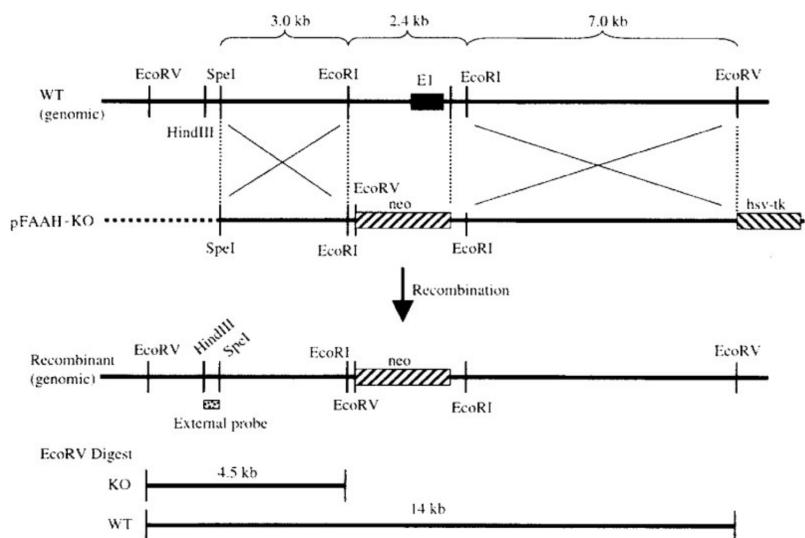


Figura 1. Esquema de la generación del ratón FAAH^{-/-} ([Cravatt et al., 2001](#)).

- Ratones *Cx3cr1*: (Jackson Laboratories, EEUU; Jung et al., 2000). Este modelo de ratón transgénico expresa la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) bajo el control del promotor del gen *Cx3cr1* (Figura 2), que codifica para el receptor de quimioquinas CX3CR1, también conocido con el nombre de receptor de fractalquina, y es expresado por la microglía, células *natural killer*, macrófagos y células T colaboradoras tipo 1 (Th1). Con el fin de evaluar cómo afecta el aumento del tono endocannabinoide en el comportamiento microglial, se generó la línea: *Cx3cr1*^{+/GFP}/*FAAH*^{-/-}.

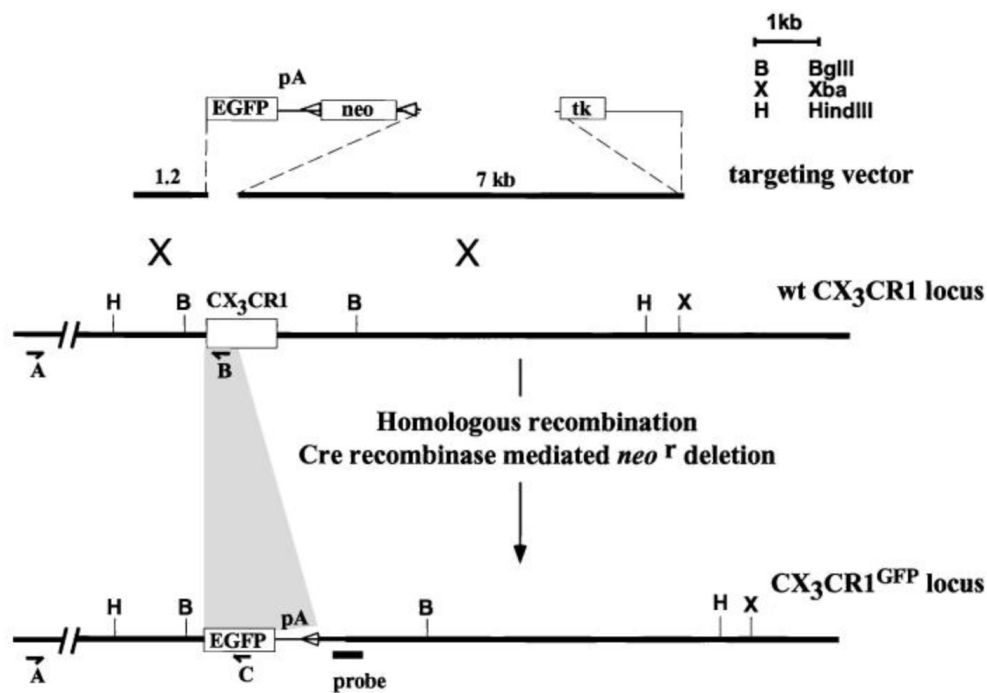


Figura 2. Esquema de la generación del ratón *Cx3cr1*^{+/GFP} (Jung et al., 2000).

- Ratones 5XFAD: Estos animales con fondo genético C57BL6 X SJL fueron suministrados por Jackson Laboratories (EEUU) y se cruzaron sucesivamente durante más de seis generaciones con ratones C57BL/6 con el fin de igualar los fondos genéticos. La línea de ratón 5XFAD contiene cinco mutaciones relacionadas con la EA de tipo familiar. Tres mutaciones en el gen *APP*: mutación Sueca (K670 y M671L), mutación Florida (I716V), mutación Londres (V717I) y dos mutaciones en el gen *PS1* (M146L y L286V) todas ellas bajo el control del promotor Thy1-murino. Estas cinco mutaciones generadas en los genes *APP* y *PS1* humanos fueron introducidas por mutagénesis sitio dirigida. Además para estudiar el papel de la enzima FAAH en este modelo de ratón se generó otro transgénico: 5XFAD/*FAAH*^{-/-}.

El modelo 5XFAD descrito previamente por Oakley et al., 2006, acelera la aparición de placas de amiloide y gliosis a los 2 meses de edad, también presenta pérdida neuronal, pero no presenta hiperfosforilación de tau. Un hallazgo interesante en este modelo de ratón, es la observación de la acumulación de A β intraneuronal a los 1,5 meses de edad, inmediatamente antes a la aparición de las placas de amiloide. Esta acumulación se ha observado en cerebros de pacientes con EA (Gouras et al., 2000; Takahashi et al., 2004). Estos animales desarrollan déficit de memoria y aprendizaje a partir del quinto mes, lo cual se correlaciona con la aparición de placas y pérdida neuronal en las zonas de corteza e hipocampo. Este déficit cognitivo no es debido a un deterioro en la actividad motora, ya que no se han encontrado diferencias en las distintas pruebas empleadas para evaluar el déficit motor (Jawar et al., 2012).

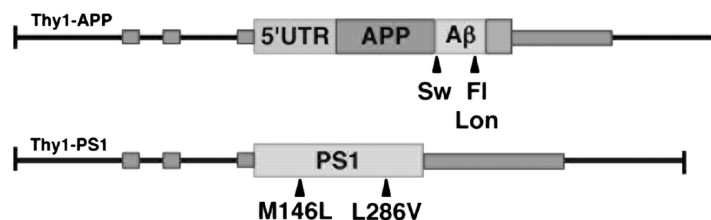


Figura 3. Esquema de los transgenes de APP y PS1 para la generación del ratón 5XFAD. Las mutaciones en ambos genes (*Thy-APP* y *Thy-PS1*) se indican con flechas. Sw, mutación Sueca; FI, mutación Florida; Lon, mutación Londres (Oakley et al., 2006).

1.1. Genotipado

El genotipado de los animales se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) a partir del ADN genómico procedente de un pequeño fragmento de la cola de los ratones. La extracción de ADN se realizó mediante la digestión de este fragmento en un tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2,5 mM pH 8, NaCl 200 mM y SDS 0,1%) con proteinasa K (0,2 mg/ml; Sigma), tras el proceso de digestión se precipitó el ADN en isopropanol y se lavó en etanol al 70%. La calidad e integridad del ADN genómico obtenido se comprobó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y la concentración de ADN se midió en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su análisis por PCR.

La PCR se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) a partir de 30-50 ng de ADN, y los productos de la PCR se

analizaron en geles de agarosa al 1,5% (en el caso de los ratones 5XFAD y FAAH^{-/-}) o 2,5% (en el caso de los ratones Cx3cr1) en tampón Tris/borato con EDTA 0,5X (TBE), con el colorante GelRed a 1X (Biotium). Las muestras se corrieron en una cubeta de electroforesis que contenía TBE 0,5X, a un voltaje de 120 V durante 30 min, y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Transilluminator 2000; Bio-Rad), determinando la existencia de los correspondientes fragmentos con ayuda de un marcador de peso molecular. En el genotipado de la colonia de ratones FAAH, los animales FAAH^{-/-} presentaron una banda de 300 pares de bases (pb), los animales FAAH^{+/+} una banda de 200 pb y los heterocigotos presentaron ambos fragmentos. En el genotipado de la colonia de ratones 5XFAD, los ratones con la patología amiloide presentaron una banda de 500 pb tanto en la amplificación del gen APP como en la del gen PS1, mientras que los ratones WT no presentaron ninguna banda. En cuanto al genotipado de ratones Cx3cr1, los ratones Cx3cr1^{+/GFP} presentaron una banda de 1200 pb, los WT una banda de 970 pb y los heterocigotos presentaron ambas bandas. Las secuencias de los *primers* utilizados en el genotipado se detallan en la Tabla 1.

Primers	Secuencia (5'3')
FAAH 1	TAA CTA GGC AGT CTG ACT CTA G
FAAH 2	ACT CAA GGT CAG CCT GAA ACC
NEO 3	TTT GTC ACG TCC TGC ACG ACG
hAPP-S	AGA GTA CCA ACT TGC ATG ACT ACG
hAPP-A	ATG CTG GAT AAC TGC CTT CTT ATC
hPS1-S	GCT TTT TCC AGC TCT CAT TTA CTC
hPS1-A	AAA ATT GAT GGA ATG CTA ATT GGT
CX3 Het	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG
CX3 Mut	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG
CX3 Wt	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG

Tabla 1. Secuencias de los *primers* utilizados para el genotipado de los animales

2. DISEÑO EXPERIMENTAL 1: ESTUDIO *IN VIVO* DE LESIÓN AGUDA. MICROSCOPIA INTRAVITAL

2.1. Genotipo, edad, número y mantenimiento

Se utilizaron ratones macho de 2-3 meses de edad con los siguientes genotipos: WT, Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{+/+} y Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{-/-}. El número de animales empleados en este estudio fue de 9-12 por grupo y tratamiento.

Los animales fueron suministrados por Jackson Laboratories, y se mantuvieron en el estabulario de la Universidad Rey Juan Carlos (Madrid). Para el manejo y sacrificio de los animales se siguió la normativa europea 86/609/EEC que regula la investigación animal.

2.2. Procedimiento experimental para el desarrollo de la ventana craneal

La microscopía intravital proporciona una herramienta muy útil para la observación detallada de la dinámica de diversos procesos celulares *in vivo*. En nuestro caso esta técnica nos permitió estudiar la región cortical del cerebro de ratón, y el protocolo seguido, previamente descrito por el Dr. Wen-Biao Gan (Skirball Institute, EEUU), se detalla en los siguientes apartados.

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i.p) de ketamina (Pfizer) y xilazina (Bayer) a una dosis de 80 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. Con el fin de evitar la hipotermia, la temperatura corporal estuvo controlada y mantenida durante todo el procedimiento a 37°C con una manta térmica. Además, para controlar la posible deshidratación, se suministró un bolo de suero glucosado (glucosa 20 mM) subcutáneamente cada hora. Se aplicó una pomada ocular lubricante (Lipolac) con el fin de evitar que los ojos del animal se secaran. Todas las soluciones que se aplicaron sobre la corteza cerebral del ratón se precalentaron previamente a 37°C.

Para realizar la ventana craneal se comenzó haciendo una incisión longitudinal sobre la piel para así exponer el cráneo. Tras la separación del periostio, se procedió a la colocación de una cuchilla sobre el cráneo del ratón con el fin de inmovilizar el animal al soporte y poder realizar la ventana craneal de una forma

segura. Una vez inmovilizado el ratón, se dispuso bajo una lupa binocular y con ayuda de un micro-taladro de alta velocidad se realizó un surco circular de unos 3 mm de diámetro en uno de los hemisferios. La perforación se hizo intermitentemente y se añadieron periódicamente unas gotas de solución de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, del inglés *artificial cerebrospinal fluid*: 125 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM glucosa; 10 mM HEPES; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgSO₄; pH 7,4) atemperado a 37°C, para mejorar el edema y facilitar la extracción de cráneo. Tras levantar la región de cráneo formada en el interior del surco se procedió a la eliminación de las meninges con unas pinzas de punta muy fina y se aplicaron sucesivos lavados con aCSF. Inmediatamente después se aplicó el compuesto de interés o el vehículo durante un periodo de incubación de 30 min.

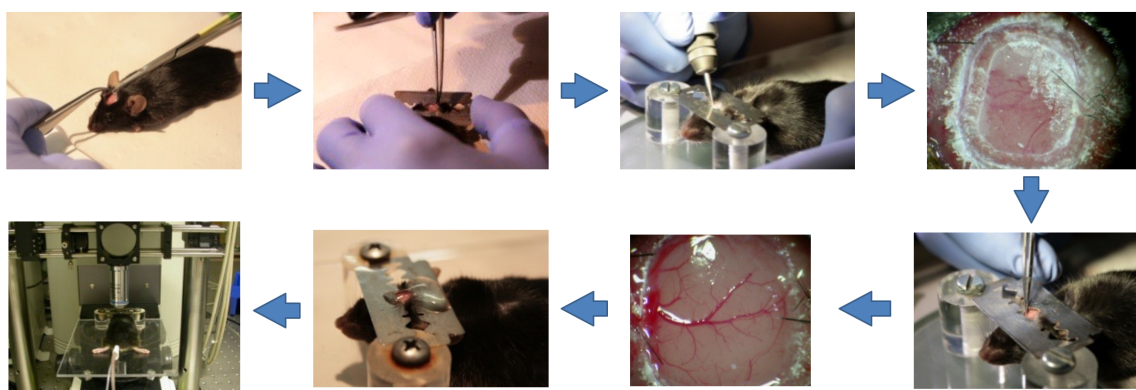


Figura 4. Resumen gráfico del procedimiento experimental

2.3. Aplicación de los compuestos

Todos los compuestos se aplicaron tópicamente (200 µl) y atemperados a 37°C sobre la superficie de la corteza cerebral durante 30 min a las concentraciones que se indican en la Tabla 2. El ácido flufenámico (FFA, del inglés *flufenamic acid*) y la apirasa, se aplicaron de forma continuada, ya que el efecto inhibitorio de estos compuestos es reversible. La AEA se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) y se disolvió en DMSO:Cremophor:aCSF en proporción 1:1:18 respectivamente. Los antagonistas SR1 y SR2 se reconstituyeron en etanol y DMSO respectivamente. El inhibidor irreversible de FAAH URB597 se disolvió en DMSO, y el resto de compuestos usados en este estudio se disolvieron en aCSF.

Las concentraciones se determinaron en base a estudios previos en tejido cerebral de ratón (Kawahara et al., 2011; Bosier et al., 2013), estudios *in vitro* (Pamplona et al., 2012; Bosier et al., 2013) y estudios *in vivo* (Davalos et al., 2005).

Compuesto	Concentración	Casa comercial
AEA	1 y 5 μ M	Cayman Chemical
SR141716A (SR1)	5 μ M	Sanofi-Aventis
SR144528 (SR2)	5 μ M	Sanofi-Aventis
URB597	1 μ M	Cayman Chemical
Apirasa	300 U/ml	Sigma Aldrich
FFA	1 mM	Sigma
Gap26	200 μ M	PolyPeptide
¹⁰ Panx1	200 μ M	PolyPeptide

Tabla 2. Compuestos y concentraciones utilizadas

2.4. Actividad hemicanal *in vivo*

El estudio de la actividad hemicanal se realizó mediante ensayos de captación de Bromuro de Etidio (BrEt; Merck). El BrEt es un fluoróforo catiónico de alto peso molecular (394,3 g/mol) que se intercala en el ADN y sólo emite fluorescencia una vez está dentro de la célula. Debido a su carácter apolar no difunde a través de la membrana plasmática, por lo que es captado por las células casi exclusivamente a través de los hemicanales. Una mayor incorporación de BrEt a la célula es indicativa de una mayor actividad hemicanal, ya sea a causa de una mayor expresión de estos en la membrana o a causa de un mayor tiempo de apertura.

2.4.1. Metodología

Tras la apertura de la ventana craneal se aplicó sobre la superficie de la corteza cerebral la solución que contenía el compuesto de interés o el vehículo, diluídos en aCSF. Tras un periodo de 30 min, se procedió a realizar dos lavados con aCSF. A continuación, se incubó durante 2 min con la solución de BrEt diluido en aCSF a una concentración de 2,5 μ M, y tras un par de lavados más se procedió a la adquisición de imágenes.

El estudio cinético de captación de BrEt se realizó de la misma forma, pero en este caso se realizaron repetidas incubaciones de BrEt cada 10 min con su correspondiente registro de imágenes hasta completar 1 h de observación. Y para los estudios de actividad hemicanal tras la ablación láser se realizaron dos registros, uno previo a la ablación láser (basal) y otro posterior (post-lesión), cada uno con su correspondiente incubación de BrEt antes de la adquisición de la imagen.

2.4.2 Captura de imágenes

Las imágenes se captaron con un microscopio confocal (Nikon Eclipse 90i + cabezal de escaneo láser C1), controlado por el *software* Nikon EZ-C1 y usando un objetivo de inmersión en agua (60X/1,2X). Se eligió una profundidad de al menos 50-70 μm desde la zona más superficial de la corteza con el fin de evitar la activación celular causada por la craneotomía.

Para realizar el “z-stack” (conjunto de imágenes en Z) se determinó un barrido de 40 μm en intervalos de 2 μm .

2.4.3 Procesado de imágenes y cuantificación

El análisis de intensidad de fluorescencia se realizó con el *software* ImageJ-NIH (*National Institute of Health*). Para ello se cuantificaron las células (astrocitos) que captaron el colorante, aproximadamente 50-70 células por ventana craneal, y los datos de la intensidad de fluorescencia se dividieron entre el número total de células que se analizaron, expresando el resultado en unidades arbitrarias.

2.5. Respuesta microglial frente a daño agudo *in vivo*

Para llevar a cabo estos experimentos se usaron ratones transgénicos Cx3cr1^{+/GFP} que expresan la GFP en el linaje de monocitos/macrófagos, y por tanto en las células de microglía. Estas células van a ser capaces de desencadenar una respuesta protectora frente al daño causado por la lesión láser, que podremos estudiar con detalle.

2.5.1. Metodología

Una vez finalizado el tiempo de incubación con el compuesto de interés, se realizaron un par de lavados con aCSF y se situó al ratón bajo un sistema de microscopía multifotón acoplado a un microscopio confocal (Nikon Eclipse 90i +

C1). Una pequeña región seleccionada de la corteza cerebral se lesionó con un láser pulsado de femtosegundos (Chameleon Ultra II, Coherent) para producir un daño agudo de unas dimensiones y profundidad controladas. Para ello la longitud de onda se estableció a 750 nm, la potencia a 80 mW y se focalizó el láser con el zoom máximo durante 10 seg (Davalos et al., 2005).

2.5.2. Captura de imágenes

Para la captación de imágenes se usó el *software* Nikon EZ-C1 y se empleó un objetivo de inmersión en agua 60X/1.2. Se eligió una profundidad de al menos 50-70 μm desde la zona más superficial de la corteza, con el fin de evitar la activación celular causada por la craneotomía.

Para realizar el “z-stack” (conjunto de imágenes en Z) en el caso del estudio de actividad microglial se determinó un barrido de 20 μm de recorrido en intervalos de 1 μm (Figura 5).

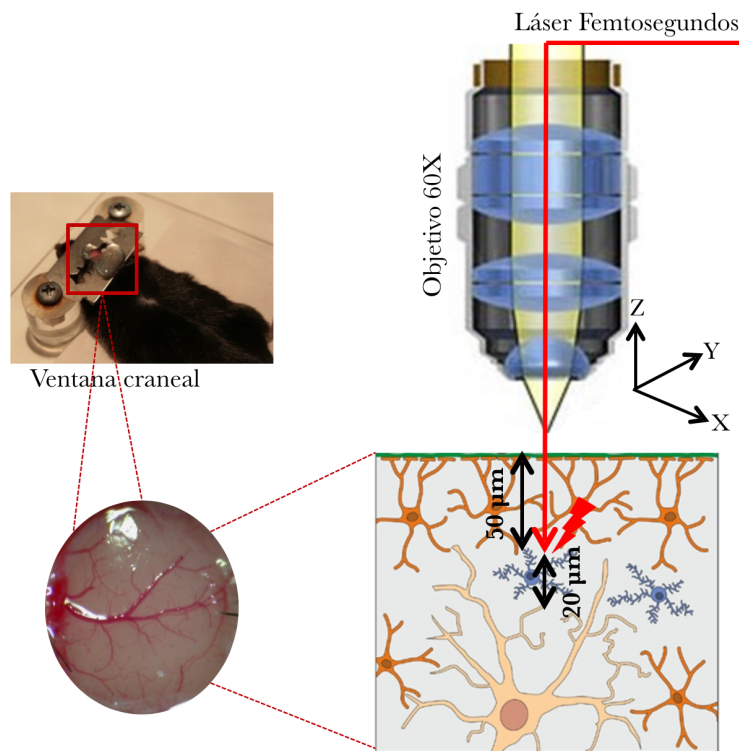


Figura 5. Esquema de la captación de imágenes

2.5.3. Procesado de imágenes y cuantificación

Todas las imágenes se analizaron con el *software* ImageJ-NIH. Para medir la fluorescencia generada por la GFP, se determinaron dos regiones de interés (ROIs, del inglés *region of interest*) alrededor de la lesión, un ROI-y de 70 μm de radio y un ROI-x de 35 μm de radio, tal y como se indican en la Figura 6. Para cuantificar la respuesta y velocidad microglial, medimos el número de procesos microgliales que entraban desde el ROI-y al ROI-x. Se calculó la respuesta microglial en un momento determinado ($R(t)$) aplicando la siguiente fórmula: $R(t) = \{R_x(t) - R_x(0)\} / R_y(0)$ (Davalos et al., 2005).

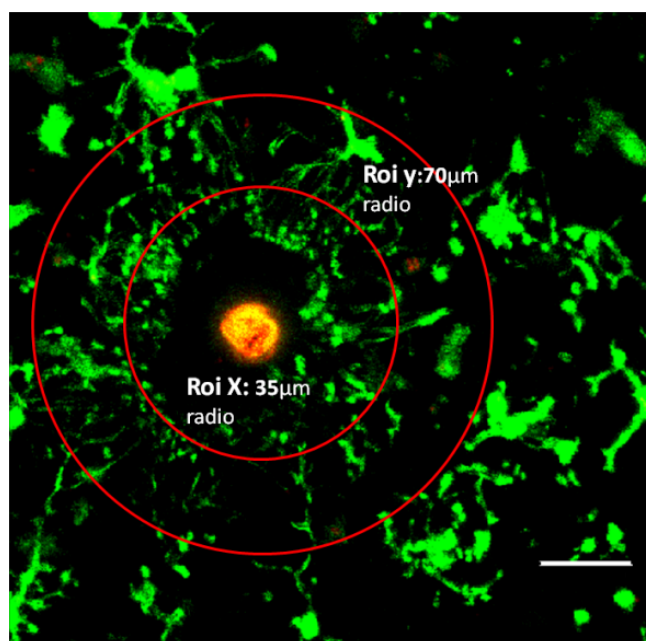


Figura 6. Cuantificación de la respuesta microglial. $R(t) = \{R_x(t) - R_x(0)\} / R_y(0)$. $R_y(0)$ o $R_x(0)$: procesos microgliales en el área Y o X (respectivamente) inmediatamente después de la lesión; $R_x(t)$: procesos microgliales en el área X en un momento determinado. Microscopía confocal. Barra de calibrado: 30 μm .

2.6. Inmunofluorescencia *in vivo*

Los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p de ketamina y xilazina a una dosis de 80 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. Con el fin de evitar la hipotermia la temperatura corporal estuvo controlada y mantenida durante todo el procedimiento a 37°C con una manta térmica.

Tras el desarrollo de la craneotomía (ver apartado 2.2.), se aplicó una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) a pH 7,4 con el fin de fijar la superficie de la corteza cerebral. Tras

5 min de incubación, se realizaron abundantes lavados con aCSF a 37°C y se incubó con el anticuerpo monoclonal GFAP conjugado con Alexa-488 (1:200; Cell Signaling Technology) atemperado a 37°C y disuelto en aCSF + Triton X-100 (Sigma) al 1% + albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) (Sigma) al 1% durante 1 h 30 min. El área expuesta se volvió a lavar con aCSF y posteriormente, para confirmar la colocalización GFAP/BrEt, se incubó durante 2 min con BrEt (2,5 μ M). Para la observación y captación de imágenes se empleó un microscopio confocal (Nikon Eclipse 90i + C1), controlado por el *software* Nikon EZ-C1 y usando un objetivo de inmersión en agua (60X/1,2X).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL 2: ESTUDIO *IN VIVO* DE NEUROINFLAMACIÓN CRÓNICA.

3.1. Genotipo, edad, número y mantenimiento

Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron ratones WT, FAAH^{-/-}, 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-} de 3 y 6 meses de edad. El número de animales empleados en este estudio fue de 9-17 por grupo para los estudios de comportamiento y el estudio de los parámetros inflamatorios, y de 4-5 para las distintas de técnicas histológicas.

3.2. Tratamientos farmacológicos

Los animales fueron sometidos a los distintos tratamientos o al vehículo mediante inyección i.p durante 12 días consecutivos. Los compuestos URB597 y SR141716 fueron disueltos en DMSO:Cremophor:salino en una proporción 1:1:18, y se administraron a una dosis de 3mg/kg/día y 5mg/kg/día respectivamente.

3.3. Pruebas comportamentales: *Morris Water Maze* y *Elevated Plus Maze*

Todas las pruebas se realizaron a la misma hora del día (9:00- 13:00), durante la fase diurna del ciclo circadiano de los animales.

3.3.1. Laberinto de agua o *Morris water maze* (MWM)

Desarrollado en 1981 por el neurocientífico Richard G. Morris para el estudio de los posibles déficits cognitivos en la memoria espacial y aprendizaje.

La prueba, llevada a cabo como indican [Vorhees & Williams \(2006\)](#), se realizó en un tanque circular de agua (120 cm de diámetro y 20 cm de profundidad) con una plataforma sumergida siempre en la misma posición que los animales debían encontrar. La plataforma se posicionó en uno de los cuadrantes del tanque, y los animales solo disponían de señales externas (figuras geométricas sencillas) dispuestas alrededor del tanque que le sirvieron como puntos de referencia para orientarse y encontrar la plataforma (Figura 7).

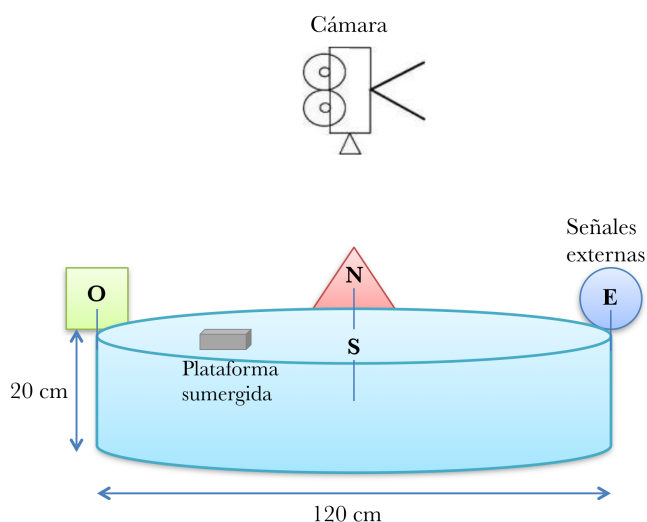


Figura 7. Laberinto acuático empleado para evaluar la memoria espacial y el aprendizaje

Los animales fueron sometidos a los distintos tratamientos o al vehículo mediante inyección i.p (URB597 3mg/kg/día; SR141716 5mg/kg/día, disueltos en DMSO:Cremophor:salino en una proporción 1:1:18) durante 12 días consecutivos, y a los 8 días desde el inicio del tratamiento iniciaron la prueba de comportamiento (Figura 8A).

Cada ratón fue liberado en el MWM desde cada uno de los puntos marcados con las señales externas (Figura 7 y 8B) permitiéndole un tiempo máximo de 60 seg de búsqueda. Una vez alcanzada la plataforma, o si el ratón no consiguió encontrarla, se dejó que el ratón permaneciese en ella 1 min el primer día y 15 seg el resto de los días. Los ratones fueron entrenados para encontrar la plataforma durante 4 días consecutivos (*Trials*). Cada uno de esos días la posición de inicio se fue cambiando y el ratón completó 4 búsquedas cada día (Figura 8B).

Esta prueba se realizó en una habitación acondicionada para ello donde la temperatura del agua estuvo controlada (22-24°C) y las condiciones de luz fueron las mismas durante el desarrollo de la prueba. Además contamos con una cámara acoplada en el techo que nos permitió registrar las distintas sesiones utilizando el *software* Smart 3.0 (Panlab), que también utilizamos para el procesamiento y análisis de los datos. El parámetro que se evaluó fue el tiempo de latencia, que es el tiempo que tarda el animal en encontrar la plataforma y subirse a ella.

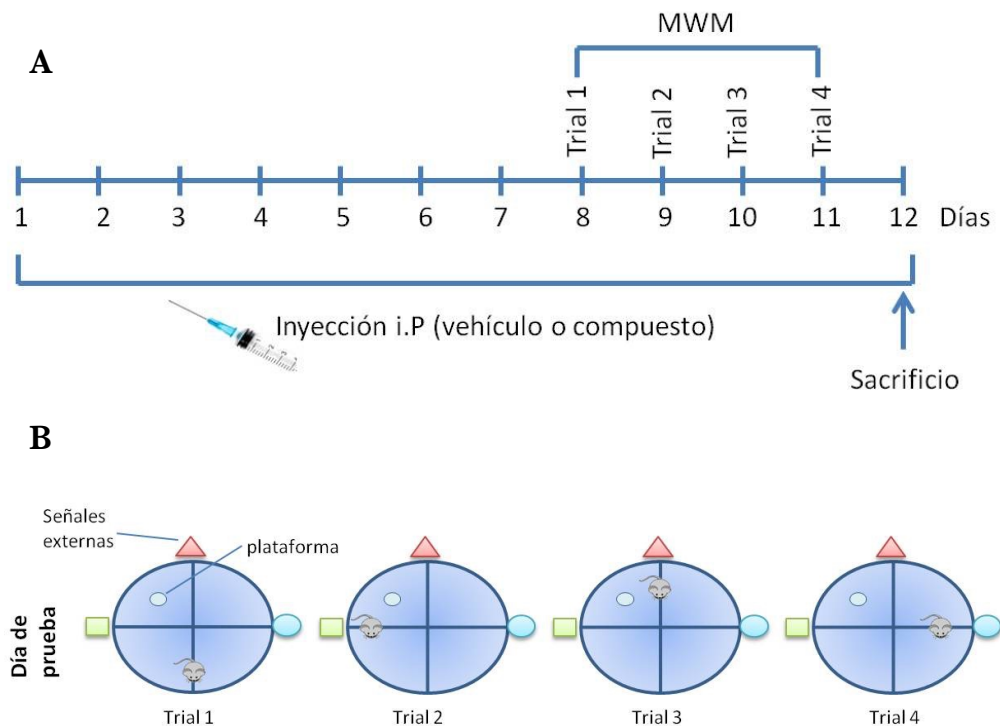


Figura 8. Cronograma del tratamiento (A) y esquema general de la prueba (B).

3.3.2. Laberinto en cruz elevado o *Elevated plus maze* (EPM)

Test para el estudio de la ansiedad que consiste en una estructura en forma de cruz compuesta por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados con paredes, elevada a 66 cm del suelo (Figura 9). Este test se basa en el miedo natural a las alturas y espacios abiertos.

Esta prueba se realizó según [Walf & Frye, 2007](#). Cada ratón fue situado en el cuadrante central y se registró su conducta durante 5 min. Para determinar el grado de ansiedad se contabilizó el número de entradas y tiempo de permanencia en cada uno de los brazos, así como el índice de evasión de los

brazos abiertos aplicando la siguiente fórmula: $[100 - (\% \text{ tiempo en brazos abiertos} + \% \text{ entradas en brazos abiertos}) / 2]$; (Trullas & Skolnick, 1993). Se considera que a mayor permanencia en los brazos abiertos menor nivel de ansiedad, ya que los ratones buscarán los espacios protegidos. El EPM se limpió con etanol al 70% antes de la entrada de cada animal con el fin de eliminar olores.

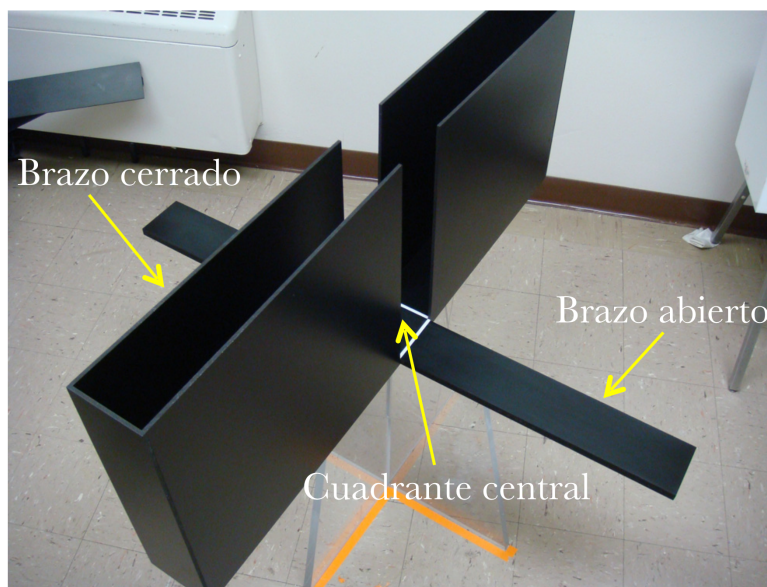


Figura 9. Foto del EPM para evaluar la conducta en ratones.

3.4. Sacrificio de los animales y recogida de muestras

Al finalizar las pruebas correspondientes, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se extrajo el cerebro que se dividió en dos mitades sagitalmente. Un hemisferio se fijó en formol durante 24 h y se utilizó para incluir en parafina hasta su procesamiento histológico y posteriores estudios de inmunohistoquímica. El otro hemisferio se congeló en isopentano y estas muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior disección y análisis.

3.5. Análisis de la expresión génica

Para analizar los cambios en la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los distintos marcadores inflamatorios se emplearon las técnicas moleculares que se detallan a continuación. A lo largo de todos estos procedimientos las muestras se mantuvieron en condiciones libres de ARNasas (que degradarían las muestras provocando bajos rendimientos de ARN) y ADNasas (para evitar posteriores interferencias).

3.5.1. Extracción de ARN y retrotranscripción

Se extrajo el ARN total de corteza e hipocampo mediante el reactivo Tripure (Roche Diagnostics). Con el fin de conocer la integridad del ARN purificado, se realizó la visualización de los ARNs ribosómicos 18S y 28S en un gel de agarosa al 1%. Para conocer la cantidad y calidad del ARN obtenido se realizó la lectura de la absorbancia a 260/280 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific). Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su cuantificación. El ARN purificado se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN siguiendo el kit Transcriptor First Strand ADNc Synthesis (Roche Diagnostics).

Reactivo	Concentración	Volumen/tubo (ul)
Oligonucleótidos	50 uM	1
<i>Random hexamer primers</i>	600 uM	2
dNTPs	10 mM	2
Tampón (con MgCl ₂)	5X	4
Inhibidor de ARNasas	40 U/ul	0,5
Retrotranscriptasa	20 U/ul	0,5

Tabla 3. Reactivos empleados en para la obtención del ADNc

3.5.2. PCR a tiempo real

Los niveles de expresión de COX-2, iNOS, TNF-α, IL6 e IL1β se analizaron por PCR cuantitativa a tiempo real usando la tecnología LightCycler (Roche Diagnostics). Para la amplificación se utilizó el kit QuantiMix Easy Probes (Biotools) con sondas Taqman. Los reactivos usados en cada PCR se detallan en la Tabla 4.

Reactivo	Concentración	Volumen/tubo (ul)
Sondas	0,2 uM	0,2
<i>Primers</i>	0,5 uM	0,5
BSA	0,5 mg/ml	1
Tampón (con MgCl ₂)	1X	10
ADN	0,05 ug/ul	2

Tabla 4. Reactivos empleados en la PCR a tiempo real

Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado, como PCRs independientes y fueron normalizadas por la expresión del gen 18S, cuya expresión es constitutiva. Para la cuantificación se usaron curvas estándar de diluciones seriadas de diez en diez y la cantidad de transcripto se calculó usando el método de la segunda derivada y cuantificación relativa con corrección de eficiencias, utilizando la versión 4.0 del *software* de LightCycler (Roche). Las secuencias de los *primers* y las sondas utilizadas se detallan en la Tabla 5. Una vez realizada la master mix, las muestras se metieron en el termociclador.

GENES	SENTIDO	SECUENCIAS
18S	Directo Reverso Sonda #55	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTC GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA Use universal ProbeLibrary, Roche Applied Science
TNFα	Directo Reverso Sonda Taqman	GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTCATT CCACTTGGTGGTTTGCTACGA 6FAM-CCATAGAAGTATGAGAGGGAGGCCATTT-- BBQ
COX-2	Directo Reverso Sonda Taqman	TGACCCACTTCAAGGGAGTCT CTGTCAATCAAATATGATCTGGATGTC 6FAM-AACAACATCCCCTTCCTGCGAAGTT--BBQ
iNOS	Directo Reverso Sonda Taqman	GCTCCTCCCAGGACCACA GCTGGAAGCCACTGACACTT 6FAM-CACCTACCGCACCCGAGATGG--BBQ
IL1-β	Directo Reverso Sonda #78	TGTGATGAAAGACGGCACAC CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG Use universal ProbeLibrary, Roche Applied Science
IL-6	RealTime-Ready LightMix IL-6	

Tabla 5. Secuencias de los primers empleados en las PCR's cuantitativas (5' a 3')

3.6. Determinación de citoquinas por ELISA

Los niveles de proteína de las citoquinas proinflamatorias IL6 e IL1 β , se cuantificaron a partir de muestras de hipocampo usando kits de ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) comerciales específicos para ratón, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Abcam). Las muestras a evaluar se incubaron con el anticuerpo específico dirigido contra cada citoquina (IL-6 e IL-1 β),

posteriormente se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado y finalmente se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (estreptavidina–HRP, del inglés *horseradish peroxidase*). La reacción se detuvo con la solución de parada y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de ELISA Multiskan EX (Thermo Scientific) para placas de 96 pocillos. Los resultados se expresaron en pg/ml tras referenciarlos a la curva estándar preparada para cada ensayo. Los límites de detección proporcionados por el fabricante fueron: IL-6 0,82 pg/ml - 600 pg/ml; IL-1 β 2,74 pg/ml - 2000 pg/ml.

3.7. Cuantificación de A β ₄₀ y A β ₄₂ mediante ELISA

Para la determinación de las proteínas A β ₄₀ y A β ₄₂ en corteza e hipocampo, se utilizaron los kits comerciales de ELISA específicos para humanos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las muestras fueron homogeneizadas en 4 volúmenes (en proporción al peso de la muestra) de una solución tampón Tris salino (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, y el cóctel de inhibidor de proteasas de Roche) durante 3 h a T^a ambiente. A continuación, se centrifugó a 100000 g durante 1 h, y el sobrenadante resultante se utilizó para la realización del ELISA. Los pocillos estaban recubiertos por los anticuerpos específicos anti A β ₄₀ o A β ₄₂ a los que se añadieron las muestras, y posteriormente el anticuerpo secundario biotinilado acoplado a HRP siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm utilizando el espectrofotómetro Multiskan EX (Thermo Scientific). Los límites de detección proporcionados por el fabricante fueron: A β ₄₀ 7,81 pg/ml - 500 pg/ml; A β ₄₂ 1,56 pg/ml - 100 pg/ml.

3.8. Análisis de la expresión de proteínas por *Western-blot*

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de muestras de hipocampo, mediante el reactivo Tripure (Roche Diagnostics), y para determinar la concentración de proteína total en los extractos, se utilizó el ensayo de proteínas del ácido bicinonínico (BCA, del inglés *bicinchoninic acid assay*; Pierce), utilizando BSA como proteína estándar para construir la curva patrón. La absorbancia a 560 nm se midió utilizando el espectrofotómetro Multiskan EX (Thermo Scientific). Las proteínas de los lisados (30 ug/muestra) se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y se electrotransfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF) (BioRad). Para bloquear las uniones inespecíficas se utilizó una solución de Tris salino con

0,1% de Tween-20 y 2% de BSA, durante 1 hora a T^a ambiente. Después y tras la realización de varios lavados, se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación, con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 6). Posteriormente y tras realizar sucesivos lavados, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a la enzima HRP específicos de cada especie (1:10000), y se incubaron durante 2 h a T^a ambiente. Por último, se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit Amershan ECL *Western Blotting detection reagent* (Healthcare Life Sciences). Tras revelar las películas radiográficas, se digitalizaron, y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante un análisis densitométrico con el software ImageJ-NIH. Los datos se normalizaron respecto a la β -actina, utilizada como control de carga.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante
anti- β -actina	1:5000	Sigma
anti-BACE	1:1000	Abcam
anti-PSN1	1:1000	Abcam
anti-APP	1:500	Merck Millipore

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en los ensayos de *Western Blot*.

3.9. Determinación de los niveles de endocannabinoides

Los niveles de AEA, PEA, OEA y 2-AG se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) acoplada a espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*) en el Departamento de Farmacología y Toxicología del Medical College of Wisconsin (Milwaukee, EEUU). Para llevar a cabo estas medidas las muestras se procesaron según el protocolo descrito previamente por Patel et al. (2005). El tejido congelado se homogeneizó en tubos de cristal de borosilicato que contenían 2 ml de acetonitrilo, mediante sonicación durante 1 h. Como estándares internos se añadieron 84 pmol de [²H₈]AEA y 186 pmol de [²H₈]2-AG (Cayman Chemical). A continuación, las muestras se incubaron durante toda la noche a -20°C para precipitar las proteínas, después se centrifugaron a 1500 g durante 5 min a 4 °C y los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo donde se evaporaron las muestras bajo una corriente de nitrógeno. Los residuos secos resultantes se resuspendieron en 300 μ l de metanol, se desecharon las proteínas precipitadas mediante centrifugación, y el sobrenadante fue de nuevo evaporado hasta su

dsecación. Los extractos lipídicos resultantes se reconstituyeron en 30 ul de metanol, de los cuales 5 ul se utilizaron para realizar el análisis mediante un cromatógrafo líquido de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas (LC/MSD serie 1100, Agilent).

Para calibrar el sistema se usaron curvas estándar para la AEA, PEA, OEA y 2-AG (Cayman Chemical). La concentración de cada endocannabinoide en las distintas muestras se calculó por comparación con el área correspondiente a su estándar interno deuterado.

3.10. Técnicas histológicas

3.10.1. Procesado histológico

Tras la fijación por inmersión en formol durante 48 h a 4°C los hemiserebros fueron tratados en un procesador automático de tejidos (Excelsior ES, Thermo Scientific). Posteriormente se realizó su inclusión en bloques de parafina y se procedió al corte de secciones sagitales de 4 µm de grosor con ayuda de un microtomo (Leica RM2235).

3.10.2. Tinción de hematoxilina-eosina

De las secciones obtenidas en el microtomo se eligió un corte cada 10 µm por cada animal para realizar la tinción combinada de hematoxilina-eosina y así obtener información de su estructura morfológica y poder seleccionar el nivel histológico de interés en las tinciones inmunohistoquímicas. Esta tinción usa dos colorantes: la hematoxilina, un colorante básico que tiñe de un color malva-azul los componentes ácidos de la célula (núcleo), y la eosina, un colorante ácido que se une a los componentes básicos (citoplasma) otorgándoles un color rosa.

El procedimiento utilizado se detalla a continuación: los cortes previamente desparafinados (3 h a 65°C) e hidratados siguiendo la secuencia: xilol, etanol 100°, etanol 96° y agua (10 min en cada uno), se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 20 min y se lavaron con agua corriente para permitir el viraje de la hematoxilina. A continuación se tiñeron con la eosina durante 3 min y se procedió a la deshidratación de los cortes siguiendo la secuencia de alcoholes crecientes: etanol 96°, etanol 100° y xilol (10 pases en cada uno). Finalmente se realizó el montaje con cubre-objetos en medio permanente.

3.10.3. Inmunohistoquímica

Una vez seleccionados los mismos niveles histológicos de interés en cada animal, las secciones de tejido se desparafinaron en la estufa durante toda la noche a 60°C. A continuación se hidrataron siguiendo la siguiente secuencia: xilol, etanol 100°, etanol 96° y agua. Posteriormente fue necesario realizar un tratamiento para aumentar la antigenicidad del tejido, sometiendo los tejidos a una temperatura y presión altas. Como paso previo a la incubación de el anticuerpo primario, los cortes se pretrataron para inactivar la peroxidasa endógena (DakoCytomation) durante 50 min a T^a ambiente, para así evitar falsos positivos. Tras varios lavados con PBS-potásico 50 mM (KPBS), los tejidos se incubaron durante toda la noche a 4°C con el el anticuerpo primario específico para cada uno de los antígenos que se muestran en la Tabla 7.

Anticuerpo 1°	Especie	Dilución	Casa comercial y Referencia
Anti-Iba1	Conejo	1:1500	Wako Chemicals (019-19741)
Anti-GFAP	Conejo	1:1000	Abcam (ab7260)
Anti-CD68	Rata	1:1000	AbD Serotec (MCA1957)

Tabla 7. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica.

Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en KPBS, que contenía un 1% de BSA (Sigma) y 1% Tritón X-100 (Sigma). Tras la incubación del anticuerpo primario durante toda la noche a T^a ambiente, se realizaron varios lavados con KPBS y los tejidos se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h a T^a ambiente (Tabla 8). A continuación se lavaron de nuevo los cortes con KPBS y se incubaron con el kit de amplificación ABC (complejo avidina-biotina; Vector) preparado 1 h antes de su uso.

Para visualizar la reacción de la peroxidasa, las secciones se revelaron con 3,3' diaminobenzidina (DAB; Dako) y peróxido de hidrógeno. Finalmente las secciones se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y xilol, y se montaron con cubre-objetos en medio permanente.

En cada uno de los experimentos de inmunohistoquímica se procesaron conjuntamente los animales de los distintos grupos (WT, FAAH^{-/-}, 5XFAD,

5XFAD/FAAH^{-/-}) para así evitar cualquier variación en la intensidad de marcaje debido a la técnica.

Anticuerpo 2º	Especie	Dilución	Casa comercial y Referencia
Anti-conejo biotinilado	Cabra	1:200	Vector Laboratories (BA1000)
Anti-rata biotinilado	Cabra	1:200	Vector Laboratories (BA9400)

Tabla 8. Anticuerpos secundarios empleados en inmunohistoquímica.

3.10.4. Tinción de placas con Tioflavina S

La Tioflavina S (Sigma) es un colorante ampliamente usado para estudiar la presencia de agregados de proteína A β ya que se une de forma específica a las hojas β dando lugar a un marcaje fluorescente verde.

Tras desparafinar e hidratar los tejidos del mismo modo que se indicó en el apartado de inmunohistoquímica, se realizó un pretratamiento con permanganato potásico (0,25%) durante 4 min para reducir el fondo, después se lavó con agua destilada y el último lavado se realizó con borohidruro de sodio al 1%. A continuación se incubaron los tejidos con buffer fosfato (411 mM NaCl; 8,1 mM KCl; 30mM Na₂HPO₄; 5,2 mM K₂HPO₄; pH7,2) durante 30 min a 4°C. Para realizar los siguientes pasos fue necesario trabajar en oscuridad. Las secciones se incubaron durante 8 min con Tioflavina S al 0.05% en etanol al 80%, a continuación se lavaron 3 veces con agua destilada y tras este paso se procedió a incubar los cortes con buffer fosfato durante 30min a 4°C. Finalmente se realizaron otros 3 lavados con agua destilada y las secciones se montaron en medio acuoso (Faramount, Dako).

3.10.5. Obtención y análisis de imágenes

3.10.5.1 Astroglisis y microglisis

Las imágenes de las regiones de interés (corteza e hipocampo) se tomaron con el microscopio Nikon Eclipse 90i con un aumento de 4X y usando el soporte informático de captación de imágenes ACT-1 manteniendo la misma intensidad de luz a lo largo de la misma técnica histológica. En cada ratón se analizaron al

menos 2 secciones de tejido. Para su procesamiento y cuantificación se utilizó el programa ImageJ-NIH, los resultados se expresaron en unidades arbitrarias y los datos representaron la astrogliosis (área GFAP positiva) o microgliosis (área Iba1 positiva) por área total analizada de hipocampo o corteza.

3.10.5.2. Placas de amiloide

Para la detección de los agregados de amiloide se usó un microscopio confocal (Nikon Eclipse 90i + C1) y las imágenes del área de hipocampo y corteza se tomaron de forma idéntica (misma intensidad de fluorescencia, *pinhole* y objetivo) en ambos grupos de animales (5XFAD/FAAH^{-/-} y 5XFAD) y se analizaron al menos 2 secciones por cada ratón. El *software* usado para la captura de imágenes fue Nikon EZ-C1.

El análisis de cada imagen, llevado a cabo con el programa ImageJ-NIH, se expresó en unidades arbitrarias y los datos representaron el ratio entre el área ocupada por depósitos de amiloide marcados con Tioflavina S y el área total de hipocampo o corteza, según el área de interés.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad *software*). Los resultados han sido expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*). Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías en función del experimento, seguido de un test post-hoc de Tukey o con corrección de Bonferroni. En los estudios de muestras independientes a la hora de comparar 2 grupos se utilizó T-Student. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. El análisis empleado en cada caso se detallará en su correspondiente leyenda.

RESULTADOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL 1: ESTUDIO *IN VIVO* DE LESIÓN AGUDA. MICROSCOPIA INTRAVITAL

Las células gliales y más en concreto la microglía y astrogía, desempeñan un papel muy importante en situaciones patológicas o de daño al SNC. Estas células poseen la capacidad de elaborar una respuesta frente a situaciones de estrés o agresiones de cualquier índole, adoptando cambios morfológicos y funcionales, que van acompañados de una producción de citoquinas proinflamatorias, y que en su conjunto se denomina gliosis reactiva. Inicialmente esta respuesta inflamatoria (producida especialmente por la microglía) puede resultar beneficiosa, proporcionando mecanismos de defensa dirigidos a eliminar los agentes nocivos e inhibir sus efectos perjudiciales. Sin embargo, una activación excesivamente intensa o prolongada en el tiempo puede resultar nociva y exacerbar la neurodegeneración.

En respuesta a una lesión en el SNC, se produce la activación de la microglía que tiene como objetivo la neuroprotección. Tras esta activación, la microglía transforma su fenotipo de forma ramificada a una forma más ameboide, y libera distintas moléculas mediadoras como citoquinas, que son responsables de la comunicación con neuronas y astrocitos (Streit et al., 1999).

Con el fin de investigar las propiedades dinámicas de la microglía y los mecanismos responsables de su activación, así como el papel del SEC en la fisiopatología micro- y astro-glial, se puso a punto un sistema de microscopía multifotónica intravital que nos permitió estudiar la capacidad de respuesta de las células de microglía frente a un estímulo lesivo causado por una ablación láser en el parénquima cerebral.

Diversos estudios han demostrado la interacción microglía-astrocitos en condiciones de daño cerebral agudo. Además, es sabido que los astrocitos pueden comunicarse entre sí, vía hemicanales, a través de la liberación de pequeñas moléculas señalizadoras. Por ello, también se realizó un estudio de la actividad hemicanal astrocitaria. Para llevar a cabo estos experimentos se usaron ratones transgénicos Cx3cr1^{+/GFP} que expresan la proteína verde fluorescente en las células de microglía.

1.1. Caracterización de la actividad hemicanal *in vivo* en ratones FAAH^{+/+}

Las panexinas y conexinas son proteínas transmembrana presentes mayoritariamente en astrocitos, que se unen entre sí en grupos de seis formando un poro acuoso en su interior dando lugar a los hemicanales (Orellana et al., 2009).

Estos hemicanales pueden localizarse en la membrana quedando expuestos al medio extracelular. En este caso, su función consiste en mediar el paso de determinadas moléculas entre el citosol y el espacio extracelular (ATP, glucosa, etc) así como por ejemplo el paso de marcadores como el BrEt que es impermeable a la membrana (Scemes et al., 2009). Por otro lado, cuando estos hexámeros se asocian con los de otra célula adyacente forman unos canales intercelulares llamados uniones hendidura, más conocidos como *gap junctions* y en este caso su función es establecer puentes de comunicación entre las células.

A día de hoy, sólo tenemos la certeza de que los hemicanales constituidos por conexinas formen *gap junctions*. Sin embargo, si los hemicanales formados por panexinas son capaces de formar *gap junctions*, es un tema que crea mucha controversia (Sosinsky et al., 2011; Bennett et al., 2012; Giaume et al., 2013), y serán necesarios más estudios para investigar su participación en la comunicación intercelular.

Los ensayos de captación de BrEt han sido ampliamente usados para estudiar la actividad hemicanal astrocitaria en diversos estudios *in vitro*, pero hasta el momento no se han reproducido *in vivo*. Por tanto, nuestro primer objetivo consistió en la puesta a punto de estos ensayos, empleando un sistema de microscopía intravital para la observación de la corteza cerebral del ratón a través de una ventana craneal (ver apartado 2.2. materiales y métodos).

En primer lugar, confirmamos que la captación de BrEt por parte de los astrocitos era efectiva *in vivo* y cuantificable. Para ello, realizamos los primeros ensayos en ratones Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{+/+}, y como se puede observar en la Figura 1, comprobamos que el marcaje rojo fluorescente proveniente del BrEt, se restringía únicamente a lo que aparentemente eran astrocitos corticales, y en ningún caso coincidía con el marcaje verde fluorescente correspondiente a la microglía.

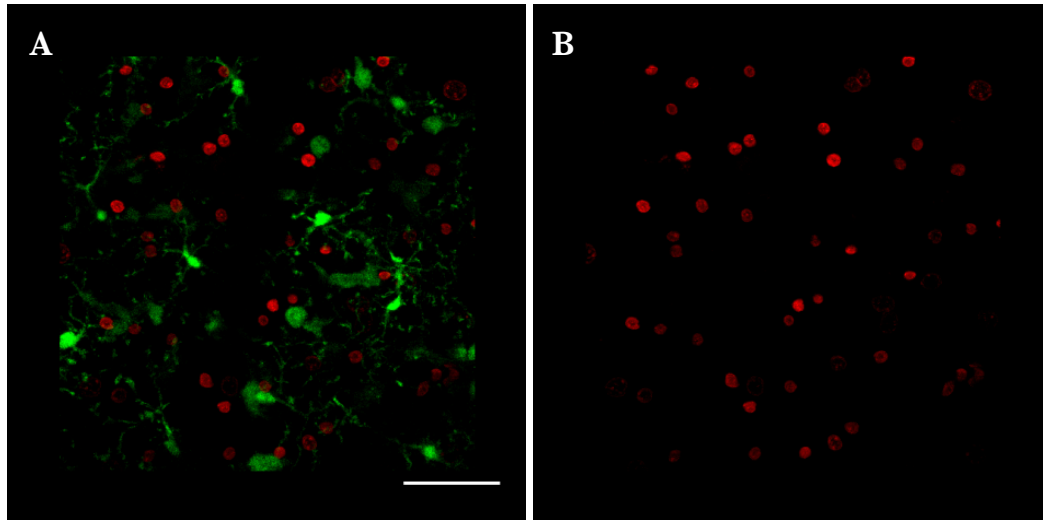


Figura 1. Imagen transcraneal de la captación de BrEt en un ratón Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{+/+}. (A) Zona representativa de la corteza cerebral en la que se puede apreciar la señal fluorescente verde proveniente de la GFP de la microglía y la captación de BrEt (rojo) en astrocitos. (B) Mismo campo de observación que A, tras la sustracción de la señal verde. Microscopía confocal (60X). Barra de calibrado: 50 μ m

A continuación y para poder confirmar que este marcaje procedía exclusivamente de astrocitos, se llevó a cabo un estudio de inmunofluorescencia *in vivo* con microscopía confocal. Para tal fin, procedimos a realizar una ventana craneal y así exponer la corteza cerebral sobre la que se realizó la técnica. En este caso realizamos la inmunofluorescencia en ratones WT, que no expresaban la GFP en las células de microglía. En la primera incubación se empleó el anticuerpo monoclonal GFAP (acoplado al fluoróforo Alexa-488), que marca selectivamente los astrocitos, y posteriormente incubamos con BrEt. Con este doble marcaje, pudimos confirmar la colocalización GFAP/BrEt (Figura 2). De modo que los astrocitos, y no la microglía ni ningún otro tipo celular, eran los responsables de la captación del BrEt.

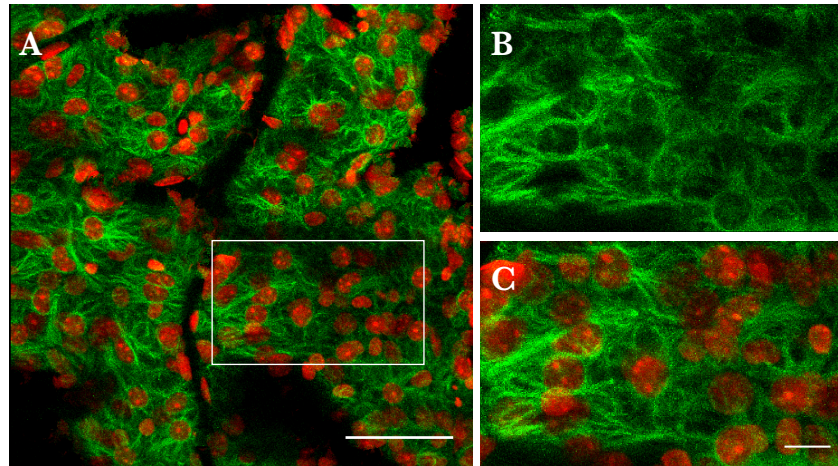


Figura 2. Inmunofluorescencia *in vivo* de GFAP en corteza cerebral de ratón. La colocalización de la señal roja proveniente del BrEt con el marcador astroglial GFAP (verde) (**A**) confirma la captación exclusiva de BrEt (rojo) por parte de los astrocitos, detalles en **B** y **C** Microscopía confocal (60X). Barras de calibrado: A 50µm; C 10 µm.

Para comprobar que la captación de BrEt se producía selectivamente por medio de hemicanales, en un primer estudio se utilizó un inhibidor inespecífico de los mismos como es el FFA, usado ampliamente en diversos estudios *in vitro* para bloquear hemicanales. Como muestra la Figura 3, tras la incubación tópica en la corteza cerebral con el FFA, observamos una fuerte disminución de la señal de BrEt emitida.

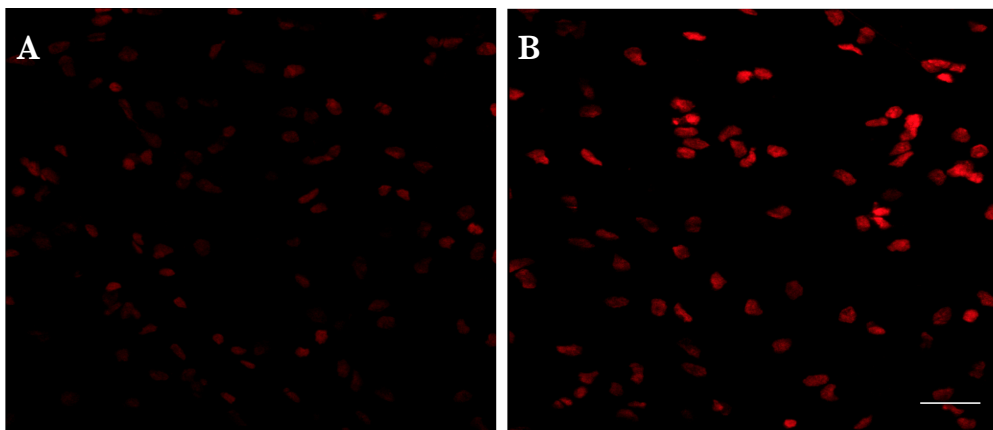


Figura 3. Efecto del bloqueante del FFA sobre los hemicanales astrocitarios. Actividad hemicanal en presencia (**A**) o ausencia (**B**) de FFA (1 mM). El bloqueo de los hemicanales astrocitarios fue evidente por la disminución de la señal roja emitida por el BrEt (A). Microscopía confocal (60X). Barra de calibrado: 50 µm

Como se ha comentado anteriormente, los astrocitos pueden presentar dos tipos de hemicanales, los formados por panexinas o conexinas. En el caso de las conexinas, la más abundante en el SNC es la Cx43 y se expresa fundamentalmente en astrocitos (Thompson & Macvicar, 2008). En el caso de las panexinas, la isoforma predominante en astrocitos es Panx1 (Ray et al., 2005; Huang et al., 2007).

Ambos hemicanales son permeables al BrEt, por ello para completar el estudio de caracterización de la actividad hemicanal *in vivo*, se hizo necesario discriminar qué tipo de canal de membrana estaba involucrado en la captación de BrEt. La permeabilidad de estos hemicanales se encuentra regulada por diversos factores, y puede ser inhibida por distintos bloqueantes específicos que suponen una gran herramienta para estudiar su mecanismo (Karpuk et al., 2011; Giaume et al., 2013).

A continuación, pasamos a utilizar inhibidores específicos para bloquear selectivamente un tipo u otro de hemicanal y comprobar si eran ambos canales o solo uno los implicados en este efecto. Los resultados obtenidos (Figura 4) indicaron que los hemicanales involucrados en los efectos observados son los de tipo Cx43, ya que la captación de BrEt se vio bloqueada por el péptido Gap26. Al mismo tiempo, pudimos descartar una participación de los canales del tipo pannexina, ya que su bloqueante específico (10 Panx1) no tuvo ningún impacto en la fluorescencia asociada a BrEt en los astrocitos corticales.

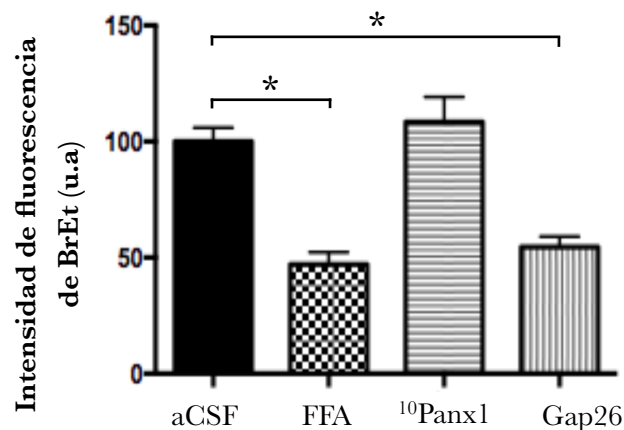


Figura 4. Efecto de los distintos bloqueantes de hemicanales astrocitarios. Cuantificación de la captación de BrEt en presencia de aCSF, FFA (1 mM), 10 Panx1 (200 μ M) y Gap26 (200 μ M). La entrada de BrEt se vio significativamente reducida tras la incubación con el bloqueante de hemicanales Gap26 y el bloqueante no específico de hemicanales FFA. Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

1.2. Análisis de la actividad hemicanal astrocitaria frente a un estímulo lesivo

En el siguiente bloque de experimentos, nos propusimos estudiar en nuestro modelo de lesión láser, el efecto que pudiera tener un daño agudo en el parénquima cerebral sobre la actividad hemicanal. Esta técnica se ha utilizado con anterioridad para caracterizar la actividad microglial *in vivo* (Davalos et al., 2005).

Para realizar este estudio contamos con un láser pulsado de femtosegundos que llevó a cabo la ablación láser en el parénquima cerebral con unas dimensiones y profundidad controladas. Tras la exposición de la corteza cerebral mediante una ventana craneal, se dispuso al animal bajo nuestro sistema de microscopía multifotónica, para definir el campo visual objeto de estudio y provocar en él una ablación láser del parénquima cerebral. Inmediatamente después, se analizó la apertura de los hemicanales mediante el ensayo de captación de BrEt, produciéndose un aumento significativo de la señal procedente del BrEt en los astrocitos adyacentes al área lesionada (Figura 5).

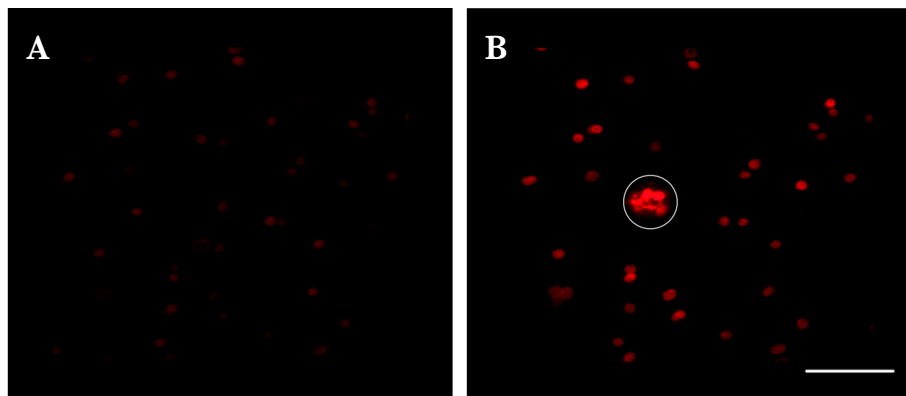


Figura 5. Efecto de la ablación láser sobre en la actividad hemicanal astrocitaria. Actividad hemicanal previa a la lesión (basal, **A**) e inmediatamente después (post-lesión, **B**). La lesión provocó la apertura de los hemicanales, que se vio reflejado en un incremento en la señal de BrEt con respecto a las condiciones basales.

1.2.1. Estudio comparativo de la actividad hemicanal entre ratones $FAAH^{-/-}$ y $FAAH^{+/+}$

En el siguiente bloque de experimentos se decidió llevar a cabo la caracterización de los hemicanales de Cx43 en ratones con la enzima FAAH inactivada ($FAAH^{-/-}$). En estos ratones los niveles de AEA se encuentran elevados y

abordamos la hipótesis de si ello podría conllevar una modificación de la actividad de los hemicanales de Cx43, dado que multitud de ensayos previos *in vitro* describen a la AEA como un potente bloqueante de las *gap junction* y es sabido que el bloqueo de estas potencia la apertura de los hemicanales, en una relación inversamente proporcional (Venance et al., 1995; Juszczak & Swiergiel, 2009; Retamal et al, 2007; Karpuk et al 2011; Orellana et al, 2013).

Por otra parte, se ha demostrado en diversos estudios *in vitro*, que los hemicanales de Cx43, desempeñan un papel importante en el intercambio con el medio extracelular de determinadas moléculas como ATP, ADP, aminoácidos e iones (Chever et al., 2014). Teniendo en cuenta estos datos previos, nos planteamos si la AEA podría estar regulando la apertura de los hemicanales y a su vez promoviendo el intercambio extracelular de ciertas moléculas como el ATP, molécula señalizadora clave en la mediación de la respuesta microglial.

Con el fin de comprobar si la inactivación de FAAH pudiera tener efecto sobre la apertura de los hemicanales en condiciones basales (previo a la lesión), y tras el efecto de la lesión láser (post-lesión), se realizó una comparación entre ratones FAAH^{+/+} y FAAH^{-/-} mediante el ensayo de captación de BrEt. Y al igual que en los ensayos realizados en ratones FAAH^{+/+}, se estudió la permeabilidad de los hemicanales tras su inhibición con el bloqueante FFA.

Como muestra la Figura 6, tras la incubación con FFA observamos una fuerte disminución de la señal emitida por el BrEt. Además observamos que la captación de BrEt basal fue significativamente mayor en los ratones FAAH^{-/-} que en los FAAH^{+/+}, indicando una mayor actividad de los hemicanales astrocitarios Cx43. Tras la ablación láser se produce un aumento significativo en ambos grupos experimentales (FAAH^{-/-} y FAAH^{+/+}), y aunque dicho incremento no muestra diferencias significativas al comparar entre sí ambos grupos, se puede observar una tendencia de los datos a mostrar una mayor apertura en los hemicanales de los ratones FAAH^{-/-}.

Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de AEA a través de la inactivación de FAAH, estaría potenciando la apertura de los hemicanales de Cx43.

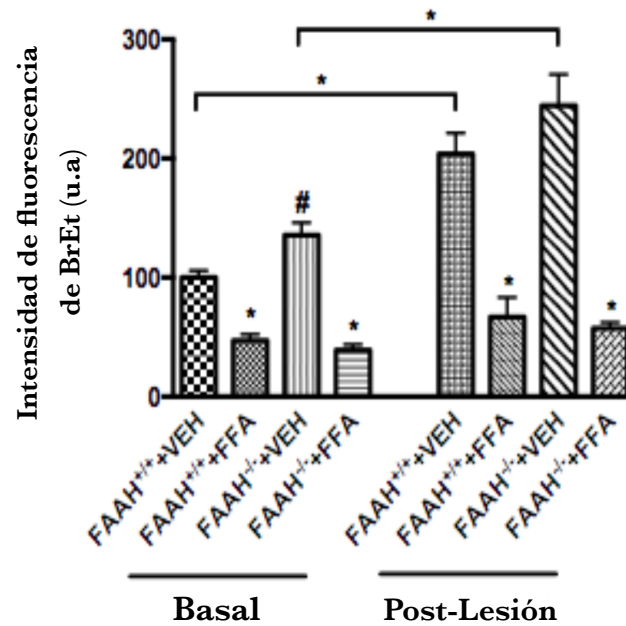


Figura 6. Efecto de la ablación láser y del bloqueante FFA sobre en la actividad hemicanal astrocitaria en ratones FAAH^{+/+} o FAAH^{-/-}. En condiciones basales la apertura de hemicanales de Cx43 fue significativamente mayor en ratones FAAH^{-/-} VEH (# $p < 0.05$ vs FAAH^{+/+} VEH basal). Tras la lesión láser, en los ratones FAAH^{-/-} VEH se observó un ligero aunque no significativo aumento en la apertura de los hemicanales respecto al grupo FAAH^{+/+} VEH. La cuantificación en presencia de FFA (1 mM) mostró una reducción significativa en la entrada de BrEt, tanto en los ratones FAAH^{-/-} como FAAH^{+/+} en condiciones basales y post-lesión(* $p < 0.05$ vs actividad hemicanal basal y post lesión del grupo VEH). Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

Además, con el fin de aportar un estudio completo de la caracterización *in vivo* de estos hemicanales, realizamos un estudio cinético de la actividad hemicanal, donde registramos los cambios en la captación de BrEt durante 1 h de observación tras la inducción de la lesión láser. Como muestra la Figura 7, inmediatamente después de la ablación láser se observó una subida en la señal procedente del BrEt. A los 20 min, la señal siguió aumentando ligeramente, no volviendo a los niveles basales (previo a la lesión) al cabo de 1 h de observación. Al final de la observación detectamos una subida en la señal que podría atribuirse al efecto *per se* de la craneotomía, ya que también vimos esta subida en ratones no lesionados.

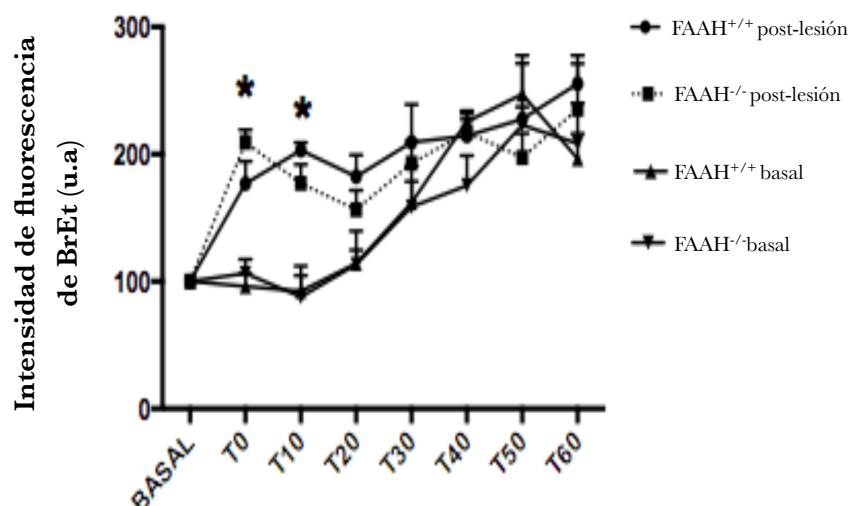


Figura 7. Cinética de la actividad hemicanal en condiciones basales y tras la lesión láser. Inmediatamente después de la ablación láser (T0) se observó un incremento significativo de la señal procedente del BrEt, que persiste en los siguientes 10 min (* $p < 0.05$ vs condiciones basales). Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

1.3. Efecto de la AEA y URB597 sobre la actividad hemicanal

Para completar el estudio del efecto observado en los ratones FAAH^{-/-} y evaluar el impacto de la AEA sobre la actividad hemicanal, procedimos a comprobar en ratones FAAH^{+/+} si la modulación exógena de la actividad de la enzima FAAH (mediante el bloqueo farmacológico con URB597) o la aplicación directa de AEA sobre la corteza cerebral, podían mimetizar los efectos observados en los ratones FAAH^{-/-}. La incubación con AEA potenció la apertura de los hemicanales, observándose un incremento significativo en la captación de BrEt; sin embargo, un inhibidor irreversible de la enzima FAAH como es el URB597, no modificó la actividad hemicanal (Figura 8).

Para determinar si el efecto causado por la AEA era mediado por el receptor de cannabinoides CB1, se aplicó un antagonista selectivo de este receptor tanto en ratones FAAH^{-/-} como FAAH^{+/+}. La incubación con el antagonista SR1 no provocó una variación significativa en los niveles basales de BrEt en ratones WT; sin embargo, fue capaz de revertir el efecto producido por la adición exógena de AEA (Figura 8). Además, produjo una disminución significativa en la actividad basal hemicanal en los ratones FAAH^{-/-}. Esta reducción encontrada, reveló una sensibilidad exacerbada de los receptores CB1 a su antagonista SR1, sugiriendo que SR1 podría estar actuando como un agonista inverso.

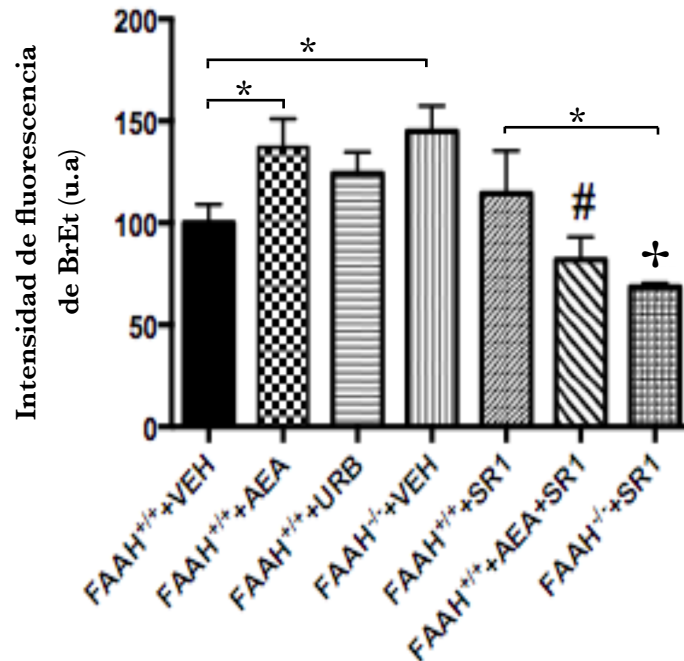


Figura 8. Impacto de la AEA sobre la actividad hemicanal *in vivo*. La aplicación exógena de AEA en ratones FAAH^{+/+} produjo un aumento de la apertura hemicanal, que se antagonizó con SR1 (# $p < 0.05$ vs FAAH^{+/+} AEA). Además, tras la incubación de este antagonista en los ratones FAAH^{-/-} la entrada de BrEt se vio significativamente reducida, indicando una disminución de la actividad hemicanal basal (+ $p < 0.05$ vs FAAH^{-/-} VEH). La aplicación de URB597 no mostró ningún cambio en la actividad hemicanal. Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

Estos resultados confirman la mediación ya conocida de AEA a través de CB1 y revelan, por primera vez en un estudio *in vivo*, la implicación de AEA en la actividad hemicanal astrocitaria. Por tanto, según estos datos, AEA podría estar ejerciendo una función inhibitoria sobre las *gap junctions* y potenciadora sobre los hemicanales, promoviendo así el intercambio extracelular de ciertas moléculas como el ATP.

1.4. Estudio de la respuesta microglial frente a daño agudo del parénquima cerebral

Una vez completados los ensayos de caracterización de actividad hemicanal y a la vista de los cambios observados en los ratones FAAH^{-/-}, decidimos estudiar la posible implicación de la Cx43 en la regulación de la respuesta microglial por daño agudo, ya que multitud de estudios previos señalan la existencia de una estrecha relación entre la actividad hemicanal en astrocitos y la respuesta microglial (Retamal et al., 2007; Orellana et al., 2011; Abudara et al., 2015).

Está descrito que a través de los hemicanales de Cx43 los astrocitos liberan ATP al medio extracelular (Kang et al., 2008). Nuestra hipótesis inicial es que, en el caso de los ratones con la enzima FAAH inactivada, el aumento en la apertura de hemicanales de Cx43 llevaría asociado un aumento en la liberación de ATP, y este ATP podría estar actuando como molécula señalizadora regulando la actividad microglial a través de los receptores purinérgicos (Illes & Ribeiro, 2004; Haynes et al., 2006).

Para realizar estos experimentos contamos con el sistema de microscopía multifotónica intravital ya descrito, que nos permitió estudiar la capacidad de respuesta de las células de microglía frente a un estímulo lesivo (ablación láser del parénquima cerebral).

Siguiendo la metodología previamente descrita por Davalos et al., 2005, tras la apertura de la ventana craneal, se seleccionó una pequeña región de la corteza cerebral y se realizó con ayuda del láser pulsado de femtosegundos, una lesión de unas 15 μm de diámetro que pudo ser visualizada gracias a la autofluorescencia generada por la lipofusina derivada de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. La inducción de esta lesión provocó la activación de las células microgliales, que en un primer momento, actuaron retrayendo las terminaciones de sus prolongaciones, e inmediatamente después, comenzaron a proyectarlas hacia el foco lesivo, de modo que al cabo de 1 h la zona lesionada resulta encapsulada dentro de los procesos microgliales.

Como se ha mencionado anteriormente, nuestra hipótesis de partida era que el aumento del tono endocannabinoide podría estar modificando el comportamiento de la microglía. Los resultados obtenidos indicaron que la inactivación de FAAH, producía una respuesta microglial más rápida hacia el foco lesivo (Figura 9A), mientras que en los animales WT (Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{+/+}), el número de procesos celulares que alcanzaron la lesión fue menor y la respuesta fue más lenta, alcanzando una fase de *plateau* a los 45 min.

El siguiente paso fue determinar si el aumento en la velocidad de la respuesta microglial era un efecto mediado por alguno de los receptores cannabinoides. Por ello, tras la exposición de la corteza cerebral se realizaron incubaciones con antagonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂ (SR1 y SR2, respectivamente). El tratamiento tópico con SR1 disminuyó significativamente la velocidad de los procesos microgliales hacia la lesión en los ratones FAAH^{-/-}, mientras que en los ratones FAAH^{+/+} no se modificó la respuesta (Figura 9C). La

incubación con el antagonista del receptor CB₂ no modificó la respuesta microglial en ratones FAAH^{+/+} o FAAH^{-/-} (Figura 9B).

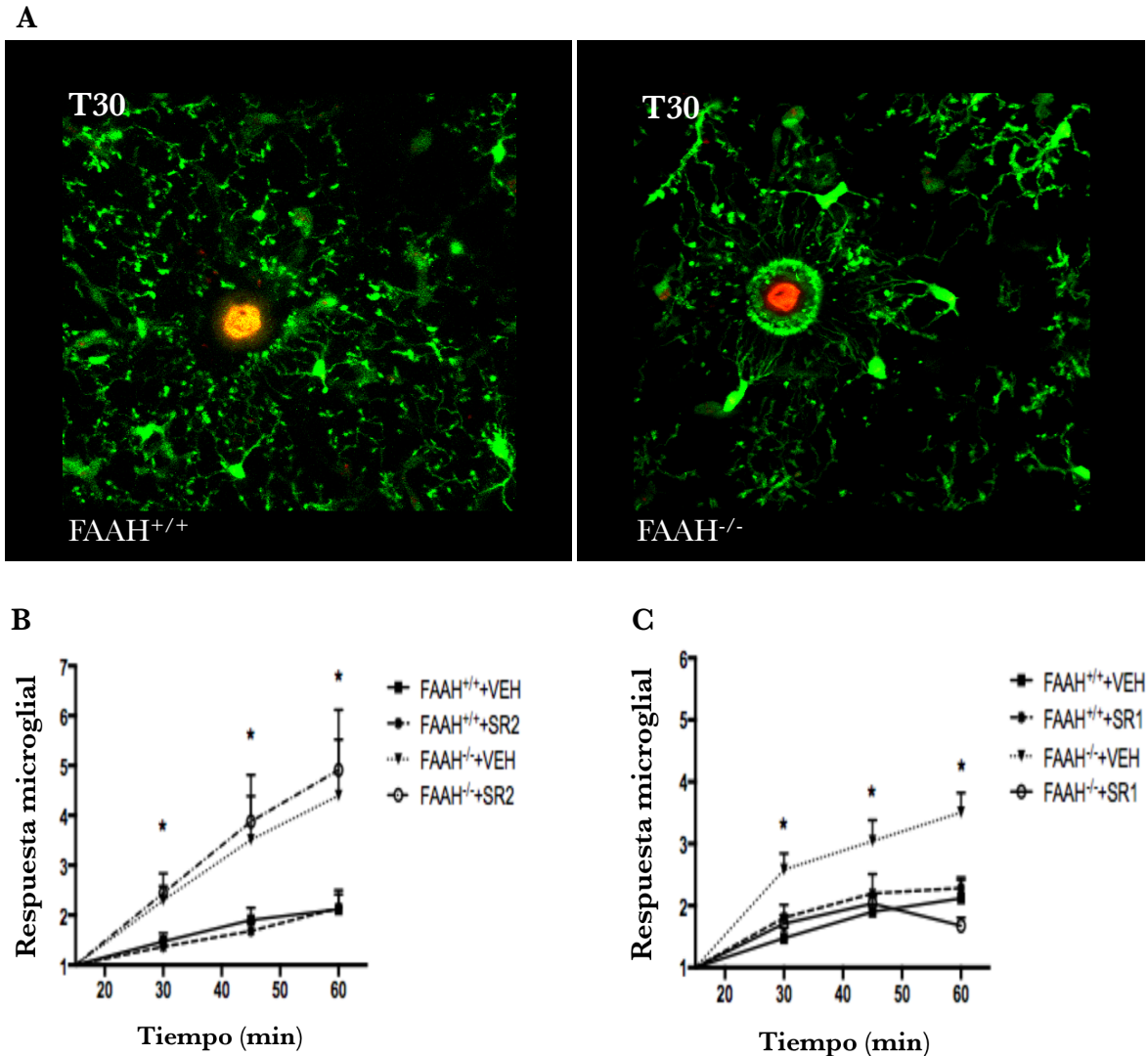


Figura 9. Respuesta microglial en ratones FAAH^{-/-} Y FAAH^{+/+}. La respuesta microglial va aumentando a medida que avanza el tiempo de observación post-lesión, siendo mayor en el caso de los ratones FAAH^{-/-}. (A) A los 30 min puede apreciarse este incremento de la respuesta microglial en los ratones FAAH^{-/-} con respecto a los FAAH^{+/+}. La incubación tópica con el antagonista de CB₂ no modificó la respuesta en ningún caso (B), mientras que el antagonista de CB₁ disminuyó significativamente la velocidad de los procesos microgliales hacia la lesión (C). Los datos representan la media \pm SEM (N=9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

Los resultados sugieren la participación de los receptores CB₁ en el efecto observado en ratones FAAH^{-/-}, y excluyen un posible efecto de los receptores CB₂, lo cual concuerda con trabajos previos, donde identificaron niveles muy bajos de expresión de receptores CB₂ en células gliales *in vivo* bajo condiciones

basales (Stella, 2004; Atwood & Mackie, 2010). Esta observación nos permite, además, proponer a la AEA como principal NAE implicada en este efecto, ya que es la única de entre las NAE sustrato de la FAAH y capaz de activar los receptores CB₁.

Datos previos de estudios *in vivo* descritos por Davalos et al., 2005, sugieren que el ATP liberado como respuesta a la ablación láser, induce la activación microglial y se considera clave en la propagación de la respuesta a la lesión. Este hecho lo pudimos confirmar tras observar la ausencia total de respuesta en presencia de apirasa (Figura 10).

Por último decidimos estudiar si la aplicación exógena de AEA o de un inhibidor de FAAH (URB597), sobre la corteza cerebral del ratón tras el desarrollo de la ventana craneal, podría activar la respuesta microglial y reproducir los cambios observados en los ratones FAAH^{-/-}. Como se observa en la Figura 10, la respuesta microglial no se vio modificada por la presencia de AEA o URB597, lo que indicaría una discrepancia entre el modelo genético y el farmacológico.

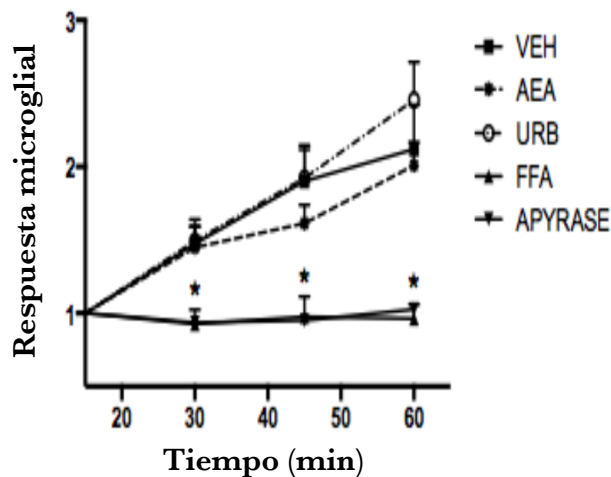


Figura 10. Respuesta microglial tras las potenciación del tono endocannabinoide y tras la inhibición de la liberación de ATP. La respuesta microglial hacia la lesión fue inhibida por el bloqueo de los hemicanales astrocitarios con FFA y en presencia de apirasa. Por el contrario, la aplicación exógena de AEA no modificó la respuesta microglial. Los datos representan la media \pm SEM (N=9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL 2: ESTUDIO *IN VIVO* DE NEUROINFLAMACIÓN CRÓNICA.

Con el fin de investigar el papel del SEC en la neuroinflamación crónica, contamos con el modelo animal 5XFAD. Éste es un modelo de desarrollo de patología amiloide agresiva y temprana. Las características fenotípicas reproducidas en este modelo de ratón son las siguientes: A los 2 meses de edad presentan depósitos extracelulares del péptido β -amiloide y altos niveles de A β intraneuronal en las regiones del hipocampo y corteza cerebral, y en paralelo se comienza a detectar gliosis reactiva. La pérdida sináptica se observa a los 4 meses, y tanto la pérdida neuronal como los déficits en la memoria espacial no se observan hasta los 5-6 meses de edad (Oakley et al., 2006; Jawhar et al., 2012).

Se ha descrito que la enzima FAAH tiene un papel clave en la regulación del SEC. En muestras de tejido cerebral de pacientes con EA se ha encontrado una sobreexpresión y aumento de la actividad de FAAH en células de la glía asociadas a las placas neuríticas, lo que sugiere la posible participación de FAAH en la modulación tanto de células de microglía como en astrocitos (Benito et al., 2003). Para evaluar el papel de la enzima FAAH en estos experimentos, realizamos una doble aproximación: inhibición farmacológica de la enzima con el compuesto URB597 y generación de una nueva línea de ratones transgénicos en los que la enzima FAAH permanece inactivada (5XFAD/FAAH^{-/-}).

Se ha descrito que en el modelo 5XFAD las alteraciones cognitivas surgen después de que se inicie la neuropatología, observándose déficit cognitivo a los 5-6 meses de edad. Para confirmar estos hallazgos decidimos establecer 2 edades de estudio: a los 3 y 6 meses de edad. Y abordamos el estudio desde dos enfoques diferentes: analizando los cambios que se producían a nivel cognitivo y analizando las modificaciones en los parámetros neuroinflamatorios.

2.1. Caracterización del modelo 5XFAD a los 3 meses de edad

Como primera aproximación realizamos los ensayos en ratones WT y 5XFAD. Y para estudiar las posibles consecuencias de la inactivación de FAAH en el modelo 5XFAD, usamos los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} y FAAH^{-/-}. En un primer estudio

sometimos a los ratones al test de MWM y en un segundo estudio medimos expresión de ARNm para distintos marcadores de inflamación.

2.1.1 Evaluación del aprendizaje y memoria espacial

En la prueba de MWM no observamos diferencias significativas en los tiempos de latencias de llegada a la plataforma entre los ratones 5XFAD y WT a los 3 meses de edad. Ambos genotipos desarrollan un aprendizaje similar con la misma evolución a lo largo de los días (Figura 11). En cuanto al grupo de animales con la enzima FAAH inactivada, los resultados del MWM no mostraron diferencias significativas entre 5XFAD/FAAH^{-/-} y 5XFAD, ni entre FAAH^{-/-} y WT (Figura 11).

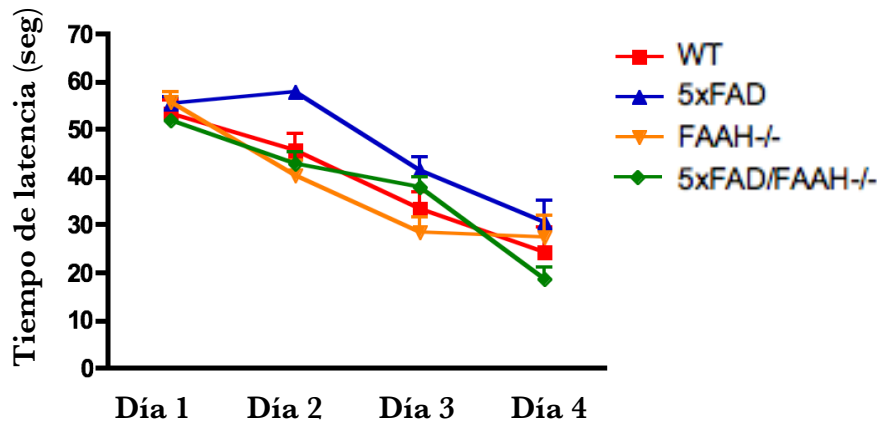


Figura 11. Tiempos de latencia en el test de MWM a los 3 meses de edad. Los tiempos de latencia disminuyeron progresivamente y de forma similar a lo largo de los días de estudio, sin encontrar diferencias significativas entre los distintos genotipos. Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2.1.2. Expresión de los parámetros inflamatorios

Para determinar si nuestro modelo 5XFAD presentaba cambios en los parámetros neuroinflamatorios a los 3 meses de edad, realizamos un estudio cuantitativo por PCR cuantitativa a partir de muestras de tejido de hipocampo, ya que es una de las principales regiones cerebrales afectadas en la EA y en ella aparecen abundantes depósitos de amiloide en el modelo de ratón 5XFAD. Se analizaron los niveles de expresión de distintos marcadores de inflamación (COX-2, iNOS, TNF α e IL1 β). No se observaron cambios en la expresión de iNOS, COX-2 y TNF α , sin embargo encontramos un incremento en IL1 β como consecuencia de la patología amiloide y de la inactivación de FAAH (Figura 12).

Los resultados de los 4 grupos se analizaron conjuntamente y se representaron los niveles de expresión del ARNm en unidades arbitrarias.

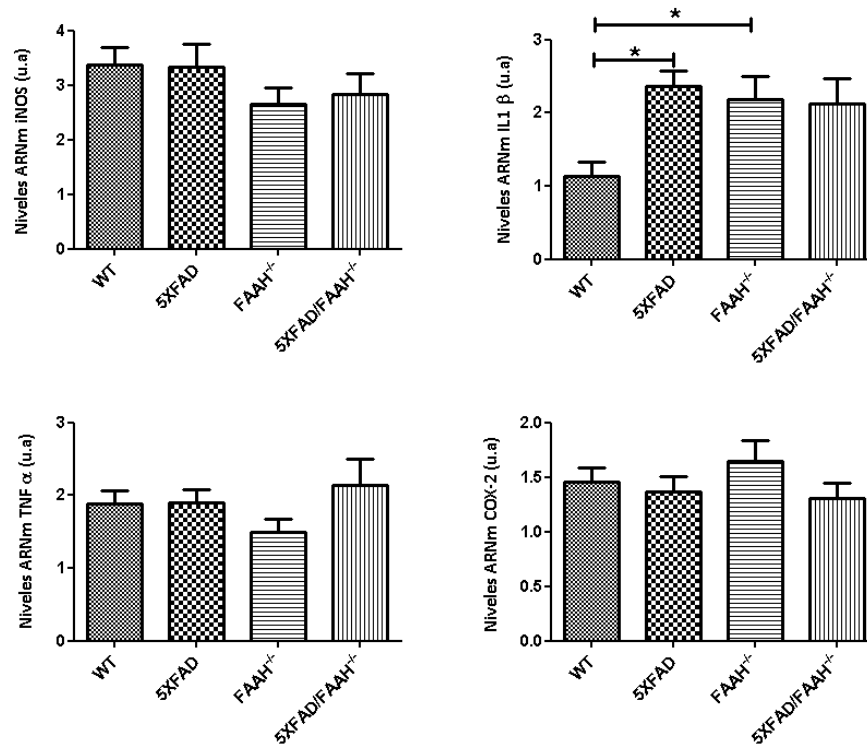


Figura 12. Niveles de ARNm para varios marcadores inflamatorios en hipocampo a los 3 meses de edad. No se encontraron diferencias significativas para los marcadores iNOS, COX2 y TNF α . La expresión de IL1 β se vio aumentada en los grupos FAAH^{-/-} y 5XFAD. Los datos representan la media \pm SEM (N=6-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

2.2. Caracterización del modelo 5XFAD a los 6 meses de edad

Una vez analizado el grupo de animales a los 3 meses de edad y dado que no encontramos diferencias significativas (con excepción de la IL1 β), se abordó el análisis del grupo experimental a los 6 meses de edad.

Al igual que hicimos en el grupo de 3 meses, primero realizamos los ensayos en ratones WT y 5XFAD, y para estudiar las posibles consecuencias de la inactivación de FAAH en el modelo 5XFAD, usamos los ratones FAAH^{-/-} y 5XFAD/FAAH^{-/-}. Para ello, se realizaron tests para el estudio de la conducta y memoria espacial (MWM y EPM), se estudió la expresión de distintos marcadores inflamatorios (COX-2, iNOS, TNF- α , IL6 e IL1 β) y se realizaron

distintas técnicas histológicas (tinción de placas con Tioflavina S, y análisis de la expresión de células astro- y micro-gliales mediante inmunohistoquímica)

2.2.1. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial

Para determinar las posibles alteraciones cognitivas se realizó el test de MWM. En la Figura 13 se muestra el tiempo de latencia de llegada a la plataforma. Los ratones 5XFAD mostraron una alteración en la memoria espacial característica de la enfermedad y que está en consonancia con anteriores publicaciones del mismo modelo animal (Oakley et al., 2006).

En el caso de animales con la enzima FAAH inactivada, estas alteraciones cognitivas observadas en el grupo 5XFAD, no se presentaban en el grupo 5XFAD/FAAH^{-/-}, donde encontramos unos tiempos de latencia menores y estadísticamente significativos en los dos últimos días de prueba en comparación con el grupo 5XFAD.

Es importante destacar, como se ha demostrado anteriormente (Jawhar et al., 2012), que los ratones 5XFAD a los 6 meses de edad no presentan ningún deterioro en la actividad y coordinación motora, como revelan las distintas pruebas (rota-rod, suspensión de la cuerda y barra de equilibrio) empleadas para evaluar los posibles déficits motores.

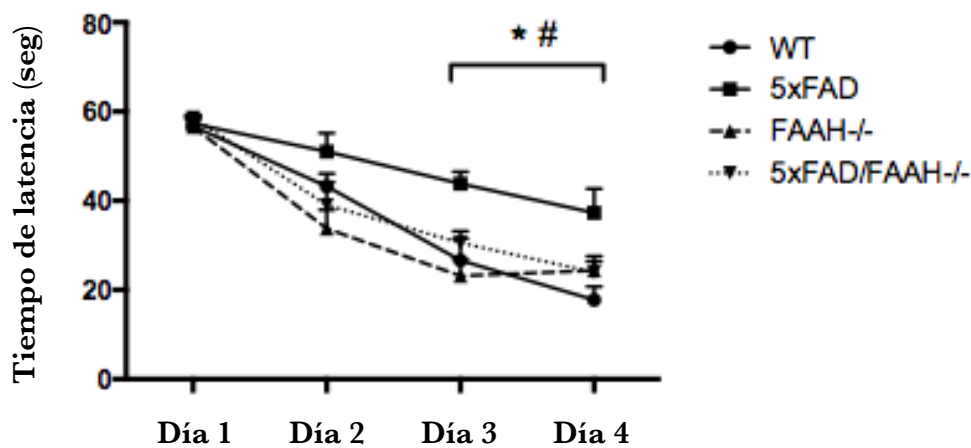


Figura 13. Tiempos de latencia en el test de MWM a los 6 meses de edad. El tiempo de latencia disminuyó progresivamente a lo largo de los días de estudio, siendo mayor en el caso de los ratones 5XFAD. La inactivación de FAAH (5XFAD/FAAH^{-/-}) previno el deterioro cognitivo inducido por el depósito de A β . Los datos representan la media \pm SEM (N=9-17 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2.2.2. Evaluación conductual en el laberinto elevado en cruz

A tenor de los resultados obtenidos en el MWM y para descartar un posible efecto de la ansiedad sobre el aprendizaje y la memoria espacial, se estudió la conducta de estos ratones en el EPM. Los resultados presentados en la Figura 14 mostraron un efecto ansiolítico ligado a la enfermedad, que concuerda con datos previamente descritos en este modelo de ratón (Oakley et al., 2006; Jawhar et al., 2012). El número de entradas y tiempo de exploración en los brazos abiertos entre los grupos WT y FAAH^{-/-} no presentó diferencias, lo cual sugiere que la mejoría en la memoria espacial que veíamos en la Figura 14 por parte de los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} es independiente de los niveles de ansiedad, pudiendo así corroborar que los efectos encontrados en el MWM se deben a alteraciones de la memoria.

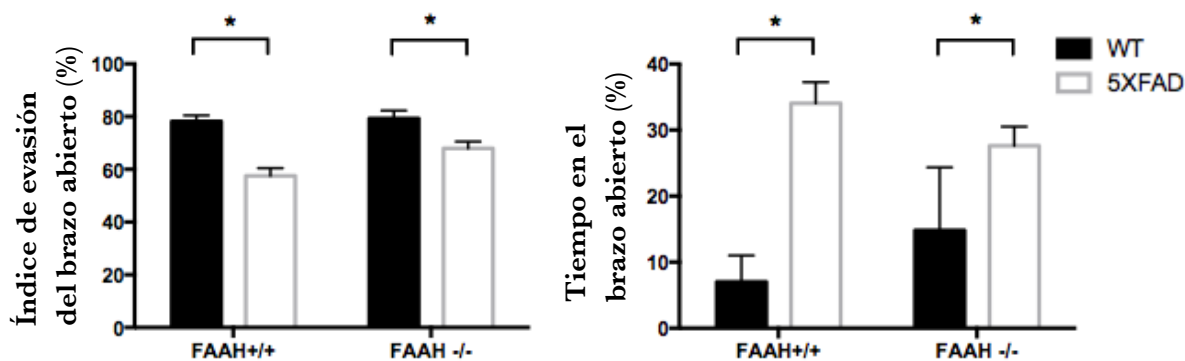


Figura 14. Evaluación conductual en el EPM. No se encontraron diferencias ni en el índice de evasión de los brazos abiertos (A), ni en el porcentaje de exploración que pasan en ellos (B) entre los distintos genotipos de FAAH. Por el contrario, sí vemos un efecto ansiolítico ligado a la enfermedad (* $p < 0.05$ (WT vs 5XFAD), # $p < 0.05$ (5XFAD vs 5XFAD /FAAH^{-/-}). Los datos representan la media \pm SEM (N=9-17 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2.2.3. Efecto de URB597 y SR1 sobre el aprendizaje y la memoria espacial

Para completar este estudio, procedimos a comprobar en los ratones 5XFAD, si el bloqueo farmacológico de la enzima FAAH (mediante el tratamiento con URB597) podría mimetizar los efectos observados en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} y además decidimos explorar si esta mejoría de la memoria espacial era un efecto mediado por los receptores CB₁ a través del tratamiento con el antagonista selectivo SR1. Sin embargo el tratamiento con URB597 no modificó el comportamiento de los animales con la patología, lo cual sugiere que aunque el

URB597 sea un potente inhibidor de la FAAH, no es capaz de mimetizar la respuesta producida a través de la inhibición genética. En cuanto al tratamiento con el antagonista SR1, los resultados mostraron la ausencia de cambios, tanto en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} y FAAH^{-/-}, como en su administración conjunta con URB597 en los ratones con la patología, indicando que el efecto de la disminución en el tiempo de llegada a la plataforma encontrada en el grupo 5XFAD/FAAH^{-/-} no estaba mediado por los receptores CB₁ (Figura 15).

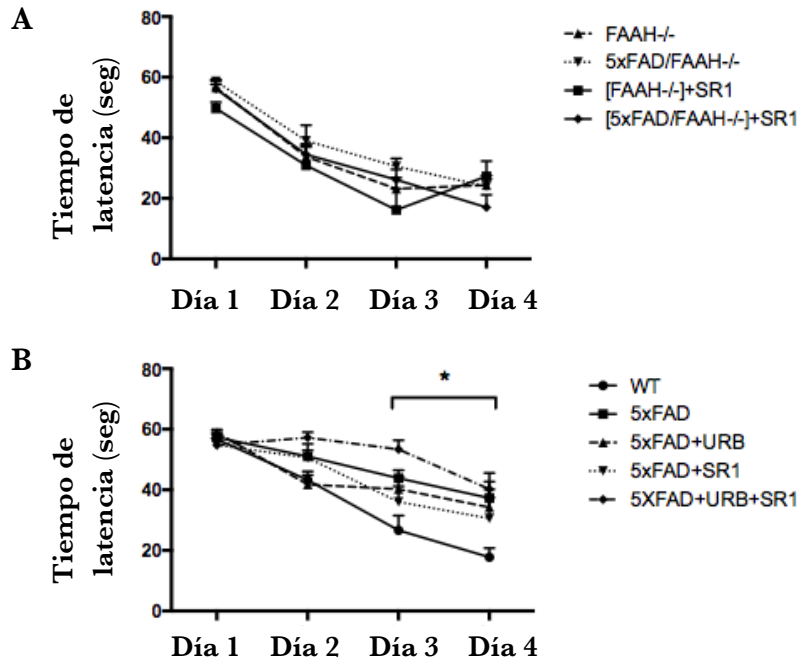


Figura 15. Efecto de URB y SR1 sobre los tiempos de latencia en el test de MWM. Tras la administración diaria de los fármacos (URB597 3mg/kg; SR1 5mg/kg) durante 12 días, se valoró el tiempo de latencia en encontrar la plataforma. Ni SR1 (A), ni URB597 (B) fueron capaces de modificar el efecto de los animales con la patología. Los datos representan la media \pm SEM (N=9-17 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2.2.4. Expresión de parámetros inflamatorios tras el tratamiento con URB597 y SR1

Una de las características claves en la neuropatología de la EA es la neuroinflamación causada por la activación de células de microglía y los astrocitos, los cuales juegan un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad. Estas células gliales, una vez activadas, van a promover la liberación ROS y citoquinas proinflamatorias como IL1 β , IL6 y TNF α , que a su vez inducen la expresión de enzimas proinflamatorias como iNOS y COX-2. Este

fenotipo proinflamatorio que en una etapa temprana podría tener efectos neuroprotectores, corre el riesgo de cronificarse y generar una respuesta exacerbada, conocida como gliosis reactiva, que contribuye a potenciar la neurodegeneración.

Para determinar la expresión de estos mediadores inflamatorios se realizó un estudio cuantitativo mediante PCR cuantitativa a partir de muestras de tejido de hipocampo. Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de ARNm para IL1 β , IL6 y TNF α en los animales 5XFAD (Figura 16, A a C). El tratamiento con URB597 no modificó la expresión de IL1 β y TNF α , pero incrementó significativamente los niveles de IL6 (Figura 16, B). El tratamiento con SR1 incrementó los niveles de las 3 citoquinas y este aumento fue prevenido tras el tratamiento con URB597 en el caso de IL1 β e IL6 pero no en TNF α . En el caso de las enzimas iNOS y COX-2 (Figura 16, D a E), su expresión no se vio afectada por la patología, pero aumentó significativamente por el tratamiento con SR1 (iNOS) y por la combinación de URB597 y SR1 (COX-2). El incremento observado en iNOS debido al tratamiento con SR1, se redujo de manera significativa con la combinación de URB597 (Figura 16, E).

Como vemos, en este estudio se comprobó una vez más el perfil proinflamatorio que ya se venía demostrando en otros estudios del mismo modelo animal, pero además se observa que el bloqueo de los receptores CB₁ induce un marcado incremento en los niveles de ARNm de las 3 citoquinas. Estos resultados podrían sugerir que CB₁ tiene un papel antiinflamatorio que sería bloqueado por el tratamiento con SR1.

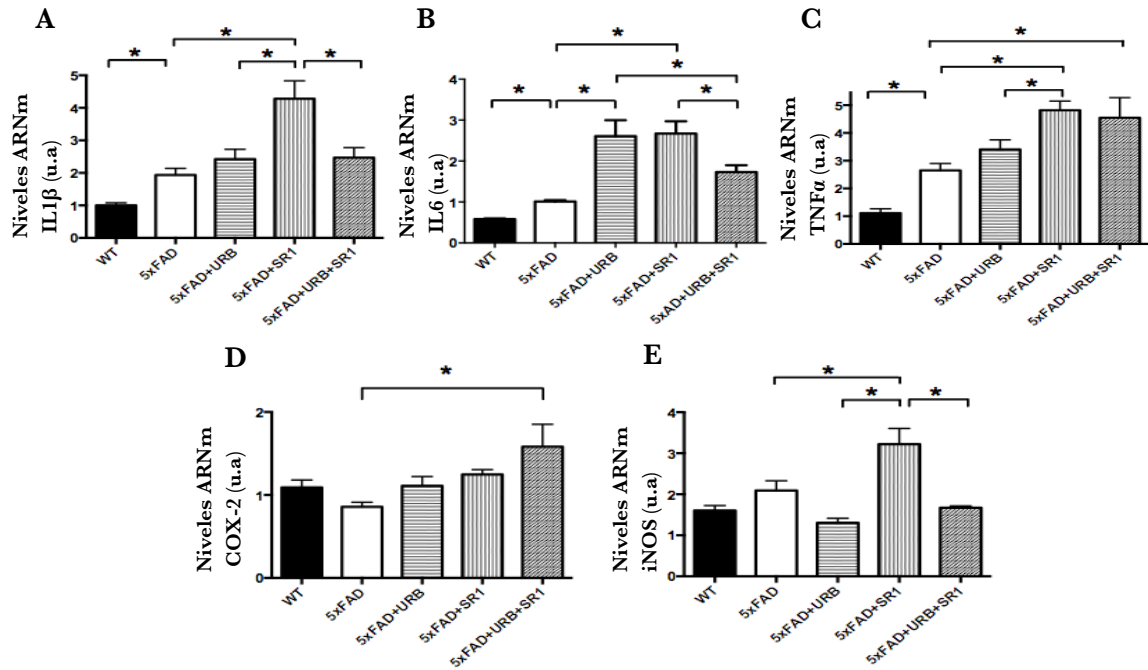


Figura 16. Niveles de ARNm de varios marcadores de inflamación. El estudio mediante PCR cuantitativa reveló en los ratones 5XFAD un aumento de los parámetros inflamatorios, que se vieron exacerbados por el bloqueo de CB₁. En el caso de los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} se observó un incremento en los niveles de expresión de las 3 citoquinas, pero no en el caso de las enzimas. Los datos representan la media \pm SEM (N= 9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

2.2.5. Efectos de la inactivación de FAAH sobre los parámetros inflamatorios

En cuanto a los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} se observó un incremento en los niveles de expresión de las 3 citoquinas (Figura 17, A a C), pero no en el caso de las enzimas (Figura 17, D y E). Además podemos observar que los niveles de IL6 se encontraban significativamente elevados de forma basal en los ratones FAAH^{-/-} respecto a los animales WT (Figura 17, B). Finalmente, el tratamiento con SR1 redujo de manera significativa la sobreexpresión de todos los parámetros inflamatorios (Figura 17, A a E).

En este caso observamos que el bloqueo de FAAH induce un fenotipo proinflamatorio que puede resultar contradictorio teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el MWM. En la discusión final se discutirán con detalle estos resultados.

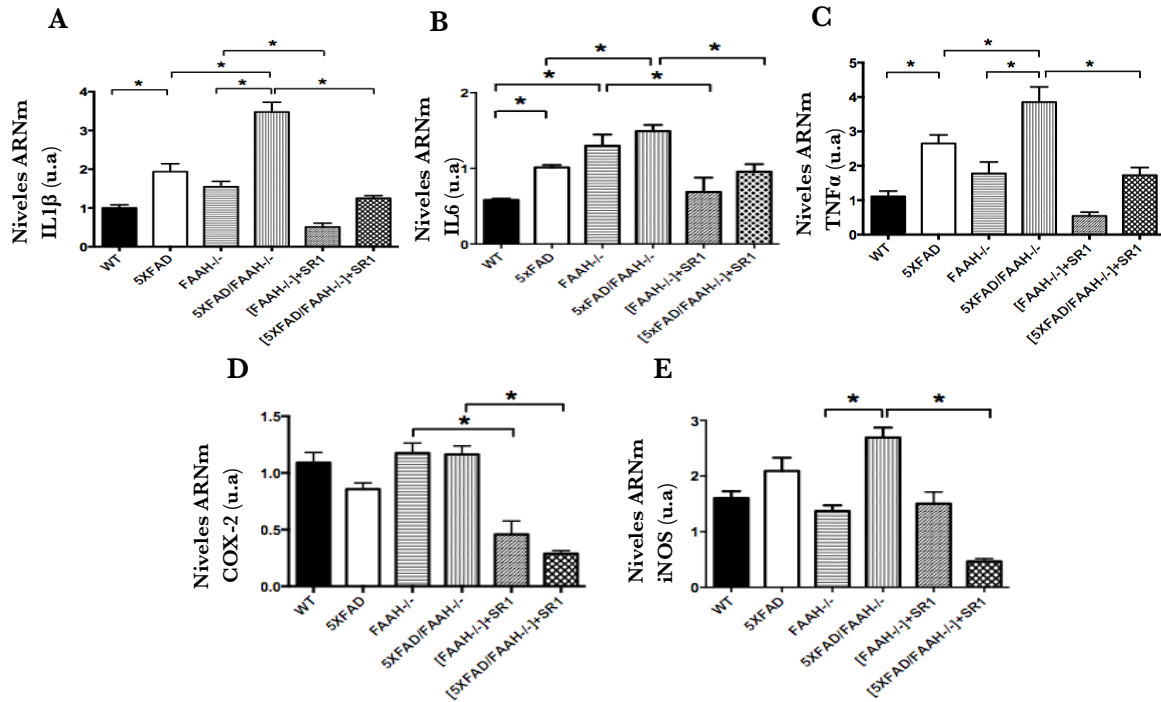


Figura 17. Niveles de ARNm de varios marcadores de inflamación. El estudio mediante PCR cuantitativa reveló en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} un incremento en los niveles de expresión de las 3 citoquinas, pero no en el caso de las enzimas. Los datos representan la media \pm SEM (N= 9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de una vía y el test (post-hoc) de Tukey.

Además, estos hallazgos muestran que los receptores CB₁ ven modificada su actividad dependiendo de los niveles de AEA (principal sustrato endógeno de la enzima FAAH), ya que en condiciones basales (en ratones FAAH^{+/+}) el bloqueo de CB₁ induce un aumento de la respuesta inflamatoria, pero en condiciones en las que los niveles de AEA se encuentran elevados (en ratones FAAH^{-/-}) se produce una respuesta antiinflamatoria.

2.2.6. Análisis de las citoquinas inflamatorias por ELISA

Posteriormente se determinó la concentración de las citoquinas IL6 e IL1β utilizando ELISAs específicos. Como se puede observar en la Figura 18, únicamente se produce un aumento en los niveles de proteína de IL-1β como consecuencia de la patología amiloide, pero no respecto al genotipo de FAAH (5XFAD *vs.* 5XFAD/FAAH^{-/-}).

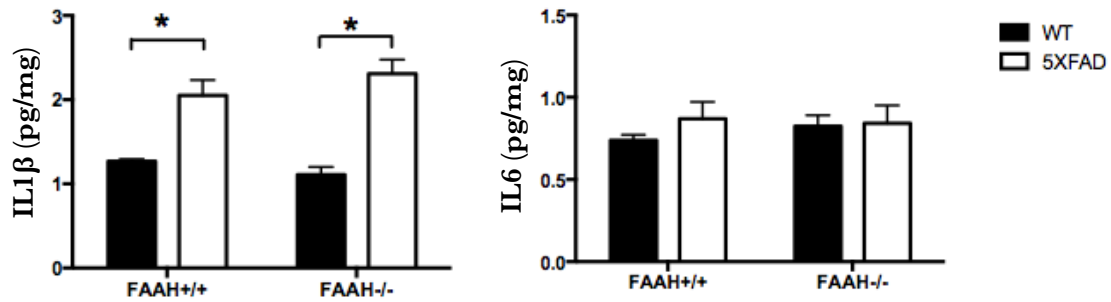


Figura 18. Resultados del ELISA de las citoquinas IL6 e IL1β. La concentración de estas citoquinas se analizó mediante un ensayo de ELISA. Únicamente se mostraron diferencias en los niveles de IL-1β como consecuencia de la patología amiloide. En ningún caso se encontraron diferencias en los niveles de IL6. Los datos representan la media \pm SEM (N=7-9 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías con corrección de Bonferroni.

2.2.7. Cuantificación de depósitos extracelulares de Aβ

El análisis de los depósitos extracelulares de Aβ se analizó utilizando como colorante la Tioflavina S que se une específicamente a la lámina β. En la Figura 19, A y B se muestra una imagen representativa de la corteza y el subículo de ratones 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}. Como cabía esperar, los ratones 5XFAD presentaron una alta densidad de placas. Al valorar cuantitativamente este marcaje, pudimos apreciar una disminución del número de placas en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} (Figura 19, C).

Estos resultados revelan por primera vez en un estudio *in vivo* de neuroinflamación crónica, la reducción de depósitos extracelulares de Aβ como consecuencia de la inhibición de FAAH, mostrando así una vez más el posible potencial terapéutico de la modulación de la enzima FAAH (en concreto su inhibición) para el tratamiento de diversas patologías del SNC, como por ejemplo la EA.

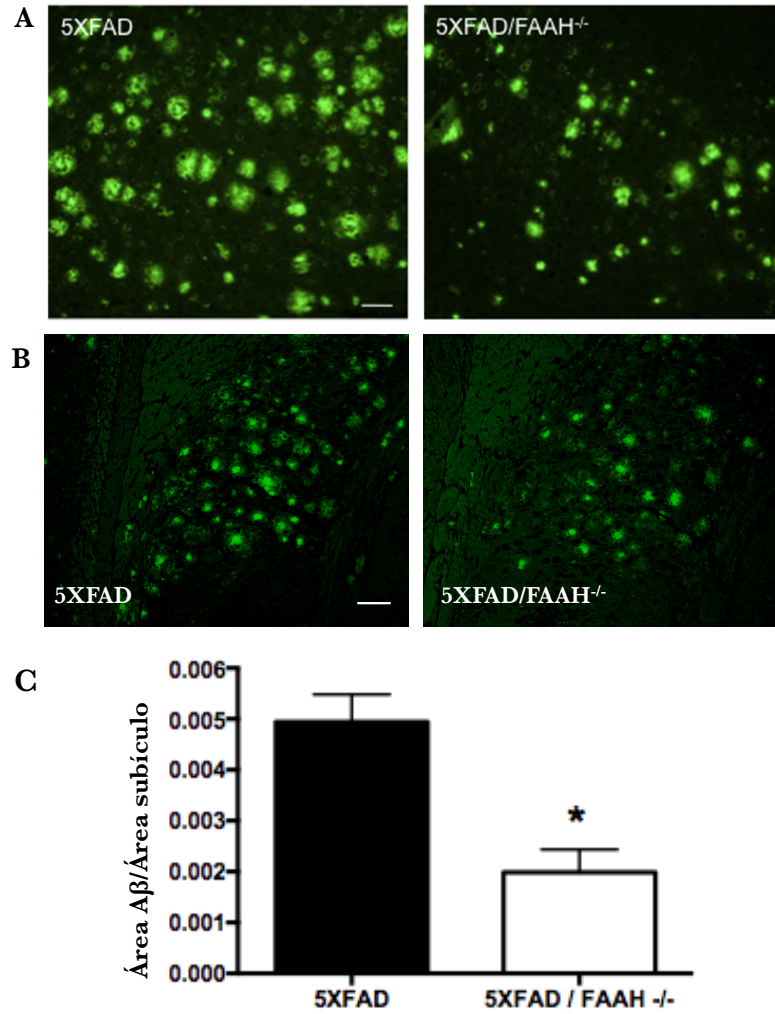


Figura 19. Tinción de placas de amiloide con Tioflavina S. Imágenes de microscopía confocal de secciones sagitales de corteza (A) y subículo (B) de ratones 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}. La acumulación extracelular de amiloide fibrilar se ve significativamente reducida en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}. Barra de calibrado: 100 μ m. (C) En la gráfica se indica el área ocupada por depósitos de A β respecto al área total del subículo. Los datos representan la media \pm SEM (N=4-5 por grupo). Para el análisis estadístico se realizó una t-Student.

2.2.8. Cuantificación de los niveles de A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂

Con el objetivo de cuantificar de una manera más precisa los cambios en los niveles de los péptidos amiloides, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, se llevó a cabo su cuantificación mediante un ensayo ELISA para cada uno de los péptidos. Los resultados de este estudio revelaron descensos significativos en los ratones con la enzima FAAH inactivada (Figura 20).

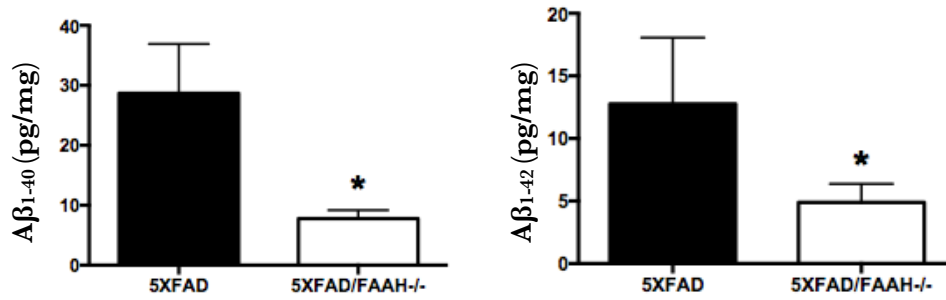


Figura 20. Resultados del ELISA de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂. Los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} mostraron un descenso significativo de los péptidos solubles de Aβ en el hipocampo. Los datos representan la media ± SEM (N=5-7 por grupo). Para el análisis estadístico se realizó una t-Student.

2.2.9. Análisis de la gliosis mediante inmunohistoquímica

Para completar el estudio y con el fin de comprobar si esta disminución del número de placas y en los niveles de amiloide soluble observados en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} iba acompañada de una menor gliosis, estudiamos mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de marcadores específicos de microglía (Iba1), astrocitos (GFAP) y microglía activada (CD68). Tras la cuantificación del área total ocupada por los astrocitos o la microglía, en las regiones afectadas por el depósito de Aβ (hipocampo y corteza), vimos en primer lugar, que la EA indujo un aumento de la gliosis al comparar con el grupo WT. En segundo lugar y tras el análisis de los ratones con la enzima FAAH inactivada (5XFAD/FAAH^{-/-}), vimos que estos presentaban una disminución significativa de ambos marcajes (Iba1 y GFAP) en comparación con los ratones 5XFAD (Figura 21, A y B). Sin embargo al analizar el marcaje de CD68 (Figura 21, C), ampliamente utilizado como marcador de activación microglial, apenas encontramos diferencias entre los animales 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}, al contrario de la disminución observada en el número total de células microgliales con el anticuerpo anti-Iba1.

Tanto el tratamiento con URB597 como con SR1, fueron incapaces de modificar ninguno de los parámetros medidos en ambos grupos: 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-} (no se muestran los datos).

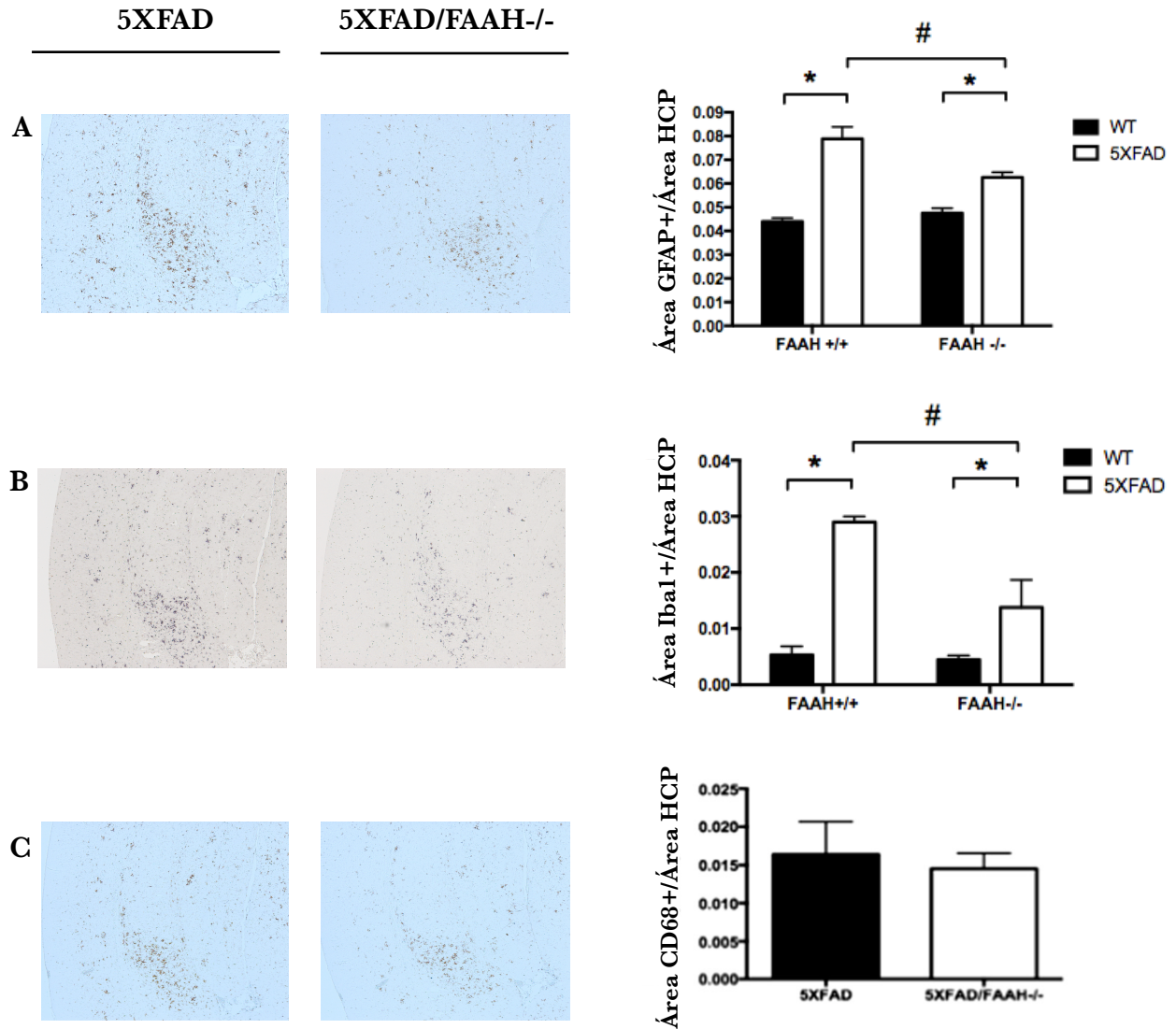


Figura 21. Marcaje con GFAP, Iba1 y CD68 en secciones de hipocampo. Imágenes comparativas de la inmunorreactividad frente a los marcadores gliales GFAP (A), Iba1 (B), y CD68 (C). Se observa una disminución en el caso de GFAP e Iba1 en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de GFAP entre los grupos analizados. Las gráficas representan el área GFAP+, Iba1+ y CD68+, en cada caso, en el hipocampo (HCP) de estos ratones. Los datos representan la media ± SEM (N=4-5 por grupo). Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA de dos vías y el test (post-hoc) de Tukey.

DISCUSIÓN

La EA es un trastorno neurodegenerativo asociado a la edad, y es asimismo la causa más común de demencia entre los ancianos. El déficit cognitivo afecta a múltiples funciones cerebrales (principalmente a nivel de la corteza e hipocampo) entre ellas la memoria, la orientación, la comprensión, el lenguaje y el juicio propio. Esta compleja enfermedad de curso progresivo y crónico, se caracteriza por una marcada inflamación, neurotoxicidad, estrés oxidativo y gliosis reactiva (astrogliosis y microgliosis), siendo estos factores determinantes para la neurodegeneración.

En la actualidad, se estima que existen 46,8 millones de personas con demencia en todo el mundo, de las cuales la EA representa entre el 50-75% de todos los casos ([Prince et al., 2015](#)). Además, el coste económico de la demencia para la sociedad en general se estima en 818.000 millones de dólares estadounidenses, según el informe anual sobre Alzheimer 2015 ([Prince et al., 2015](#)). Estos datos resultan alarmantes y demuestran que la demencia es un problema global de salud pública y que por tanto requiere una acción urgente. Sin embargo, a pesar de los grandes avances científicos y clínicos sobre la EA en los últimos 30 años, los fármacos desarrollados hasta ahora están diseñados para paliar la sintomatología de la enfermedad, y aunque mejoran la calidad de vida de los pacientes, ninguno consigue frenar la progresión de la enfermedad. Para que los futuros tratamientos resulten eficaces, será necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan hacer un diagnóstico precoz de la EA antes de que se manifiesten los síntomas, o incluso que permitan predecir el desarrollo de esta.

Las investigaciones realizadas en el campo de los cannabinoides han avanzado enormemente en la última década y están poniendo de manifiesto que la modulación del SEC, podría proporcionar beneficio terapéutico en diversas patologías, como la EA, debido a sus propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes ([Marsicano et al., 2003](#); [Fernandez-Ruiz et al., 2005](#); [Benito et al., 2007](#); [Centonze et al., 2008](#)). Además existe un gran número de evidencias que muestran un incremento de los niveles de endocannabinoides en respuesta a diversas situaciones de daño cerebral de agudo. Este hecho sugiere que los endocannabinoides estarían implicados en promover mecanismos que pueden favorecer la reparación a través de la activación de los receptores de cannabinoides (ver revisión [Bahr et al., 2006](#)).

Varios trabajos científicos han demostrado la posible implicación del SEC en situaciones de neuroinflamación ([Gowran et al., 2011](#); [Chen et al., 2012](#); [Mounsey et al., 2015](#)). En concreto, el análisis *post-mortem* de cerebros de pacientes con Alzheimer ha revelado distintas alteraciones que se producen en este sistema

de señalización endocannabinoide. Estos estudios, realizados anteriormente por nuestro grupo de investigación, demostraron un aumento en la expresión de los receptores CB₂, especialmente en las células de microglía asociadas a placas (Benito et al., 2003), habiéndose observado además una correlación entre los niveles del receptor CB₂ y los niveles de Aβ₄₂ y de placas de amiloide (Solas et al., 2013). Sin embargo, en cuanto a la expresión de CB₁, otros estudios han observado una reducción de su expresión en estadios avanzados de la enfermedad (Ramírez et al., 2005; Solas et al., 2013; Manuel et al., 2014), mientras que en otros estudios diferentes no se han encontrado diferencias en los niveles de expresión de CB₁ (Lee et al., 2010; Ahmad et al., 2014). Por otra parte, en los astrocitos hipertróficos que se localizan alrededor de las placas neuríticas, se ha detectado un aumento selectivo de la expresión de la enzima FAAH (enzima responsable de la degradación de AEA), así como un aumento en la actividad hidrolasa de la misma (Benito et al., 2003), incrementándose así los niveles de ácido araquidónico, metabolito involucrado en la respuesta inflamatoria. En recientes estudios, los niveles de AEA se encontraron reducidos en la corteza frontal y temporal, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de 2-AG (Jung et al., 2012). En este mismo estudio se observó que los niveles de AEA estaban inversamente correlacionados con los niveles del péptido Aβ₄₂.

Considerando estas evidencias, se planteó la hipótesis de que el incremento del nivel de endocannabinoides en el cerebro, a través de la inhibición de las enzimas responsables de su degradación, podría constituir una nueva diana terapéutica. En concreto, la inhibición de la actividad de FAAH podría acarrear efectos beneficiosos a varios niveles ya que, al mismo tiempo que se verían incrementados los niveles de algunos endocannabinoides (con consecuencias neuroprotectoras), se reduciría el aporte de AA en la zona afectada por el proceso inflamatorio, ya que este es uno de los metabolitos producto de la degradación de, por ejemplo, la anandamida.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el potencial del SEC como posible diana neuroprotectora en un ambiente neuroinflamatorio. Para ello evaluaremos el posible papel neuroprotector de la enzima FAAH en la actividad glial, en distintos entornos inflamatorios: 1) Modelo *in vivo* de daño agudo. Para este fin, se usó el modelo de ratón Cx3cr1^{+/GFP}, que expresa la proteína GFP en las células de microglía. 2) Modelo *in vivo* de neuroinflamación crónica con ratones 5XFAD, que constituyen un modelo animal bien establecido de la EA.

En ambos casos, y con el fin de dilucidar el papel de la enzima FAAH en un entorno inflamatorio, se plantearon dos estrategias dirigidas a la modulación de la enzima FAAH. 1) Se generaron las líneas: Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{-/-} y 5XFAD/FAAH^{-/-}, de esta manera, la enzima FAAH permanece inactiva, disponiendo así de una herramienta muy útil para el estudio de su función genética *in vivo*. 2) Por otro lado se planteó un modelo de bloqueo farmacológico con un potente inhibidor irreversible de FAAH como es URB597.

Estudio *in vivo* de lesión aguda

La aplicación de la microscopía intravital nos ha permitido estudiar *in vivo* las propiedades dinámicas de la microglía y los mecanismos responsables de su activación tras una lesión láser provocada en un área determinada de la corteza cerebral (Davalos et al., 2005). Además, también hemos podido evaluar el papel del SEC en la fisiopatología micro- y astro-glial, a través del estudio con ratones FAAH^{-/-}. En estos ratones, la enzima FAAH permanece inactiva, lo cual conlleva a un aumento de los niveles de AEA y otras NAEs, sin verse alterados los niveles de 2-AG.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto el papel modulador de la AEA sobre las células gliales en la corteza cerebral del ratón *in vivo*. De acuerdo con los hallazgos observados podemos sugerir que la AEA está implicada en regular: 1) la apertura de los hemicanales astrocitarios Cx43, promoviendo así el intercambio de ciertas moléculas como el ATP, molécula señalizadora clave en la mediación de la respuesta microglial; y 2) la velocidad de la respuesta microglial frente a un estímulo lesivo en el parénquima cerebral. En base a estos hallazgos, proponemos que la AEA podría estar implicada en modular una respuesta inflamatoria beneficiosa, al potenciar la respuesta microglial tras el daño causado por la ablación láser. Es importante destacar que la ausencia de respuesta microglial frente a este estímulo lesivo llevaría a un incremento del tamaño de la lesión, y que por tanto esta primera línea de defensa actúa limitando y frenando el daño causado por la lesión (Hines et al., 2009). Este efecto neuroprotector de la AEA está en consonancia con otros datos aportados en diferentes estudios experimentales (Hansen et al., 2000; Sinor et al., 2000; Van der Stelt et al., 2001; Veldhuis et al., 2003) (ver revisiones Mechoulam et al., 2002b; Fowler et al., 2010), y demuestran que su modulación farmacológica podría ser beneficiosa en el tratamiento de distintas enfermedades de origen inflamatorio.

En el presente trabajo, se ha pretendido evaluar mediante técnicas de microscopía intravital, el papel del SEC en la respuesta astro- y micro-glial frente

a un daño agudo. En una primera parte, los resultados de este estudio revelaron en los ratones con la enzima FAAH inactivada, una actividad hemicanal exacerbada consistente con datos previos de nuestro grupo de investigación, que sugieren que la ausencia de esta enzima produce diversos cambios en la función astrocitaria (Benito et al., 2012). En dicho estudio, la delección genética de FAAH provocó en cultivos de astrocitos expuestos al péptido A β , una respuesta inflamatoria exacerbada en comparación con los WT. Sin embargo, al contrario que en el presente trabajo, este incremento de la respuesta inflamatoria excluyó la participación de los receptores CB₁. Esta discrepancia podría explicarse por las diferencias entre ambos modelos experimentales (*in vivo* vs. *in vitro*), así como por el tipo de daño (lesión láser vs. péptido A β).

Estos hallazgos demuestran por primera vez en un estudio *in vivo*, la participación de los receptores CB₁ en el incremento de la actividad hemicanal observada en los ratones FAAH^{-/-}, y confirman la mediación ya conocida de AEA a través de estos receptores (Lopez-Rodriguez et al., 2011; Bosier et al., 2013). Estos resultados estarían en consonancia con datos previos obtenidos por otros autores (Navarrete & Araque, 2008, 2010), en los que observaron que los endocannabinoides inducían un aumento de los niveles de Ca²⁺ en astrocitos, por un mecanismo dependiente de los receptores CB₁.

En el presente trabajo también hemos podido evaluar la respuesta microglial frente a un daño agudo. Como mencionábamos anteriormente, estas células son muy dinámicas y se caracterizan por presentar multitud de ramificaciones que se encuentran supervisando constantemente el medio con el fin de desempeñar sus función fagocítica (Nimmerjahn et al., 2005). En este estudio mostramos cómo la inhibición de FAAH induce un aumento de la respuesta microglial, de manera que los procesos celulares se dirigen rápidamente hacia el foco lesivo encapsulando el daño causado, y limitando así la propagación del mismo. Nuestros datos sugieren que únicamente los receptores CB₁ parecen participar en esta respuesta exacerbada y descartan la participación de los receptores CB₂, lo cual concuerda con trabajos previos, donde identificaron niveles muy bajos de expresión de receptores CB₂ en células gliales *in vivo* en condiciones basales (Stella, 2004; Atwood & Mackie, 2010). Además, el hecho de que los receptores CB₁ parezcan los únicos implicados en este efecto, concuerda con la afinidad inferior de AEA hacia los receptores CB₂, y confirman la mediación ya conocida de AEA a través de CB₁ (Pertwee et al., 2010).

Por otro lado, en el presente trabajo hemos observado una discrepancia entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH, que estarían en sintonía con

estudios previos *in vitro* de cultivos primarios de astrocitos (Benito et al., 2012). El hecho de que un potente inhibidor irreversible de FAAH como es URB597 no modificase la actividad hemicanal, ni la respuesta microglial, sugiere que es necesario incrementar los niveles de endocannabinoides de forma mantenida (en tiempo y/o magnitud), para desembocar en los efectos encontrados. De forma alternativa, puede que estos ratones FAAH^{-/-} hallan sufrido, como respuesta a la inhibición genética, una adaptación evolutiva que no se puede lograr a través de la inhibición farmacológica.

Algunos trabajos han señalado también esta discordancia entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH (Buczynski & Parsons, 2010). Estos autores revelaron mediante la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo*, que mientras que la inhibición genética de FAAH mostraba un aumento constante de los niveles de AEA en el líquido intersticial, la inhibición farmacológica daba lugar a incrementos transitorios de este endocanabinoide.

En línea con esto, tras la aplicación exógena de AEA se observó un incremento de la actividad hemicanal, y sin embargo la respuesta microglial no se vio modificada, lo que parece indicar que es necesario, como ya hemos mencionado, potenciar el tono endocanabinoide de forma prolongada o crónica para lograr ambas respuestas. También podría ocurrir que otros mecanismos adicionales al incremento de actividad hemicanal estuvieran involucrados en el aumento de la velocidad de respuesta microglial hacia la lesión.

Finalmente, quisimos conocer si existía algún tipo de relación entre la actividad hemicanal astrocitaria y la respuesta microglial, ya que multitud de estudios previos señalan la existencia de esta estrecha relación (Retamal et al., 2007; Orellana et al., 2011; Abudara et al., 2015). Está descrito que a través de los hemicanales de Cx43, los astrocitos son capaces de intercambiar ciertas moléculas con el medio extracelular, entre ellas glucosa, iones y ATP (Schalper et al., 2010), así como marcadores impermeables a la membrana como el BrEt (Contreras et al., 2002). La liberación de ATP al medio extracelular (Kang et al., 2008), podría promover la activación microglial, debido a que este podría estar actuando como molécula señalizadora regulando la actividad microglial (Honda et al., 2001; Illes & Ribeiro, 2004; Haynes et al., 2006) a través de los receptores purinérgicos P₂X (metabotrópicos) y P₂Y (ionotrópicos) presentes en las células gliales (Burnstock & Kennedy, 1985; Dubyak & el-Moatassim, 1993).

Según se describió anteriormente, los datos de actividad hemicanal revelaron que tanto el aumento del tono endocanabinoide en ratones FAAH^{-/-}, como la

A continuación y como resumen se muestran en la Figura 1, los posibles mecanismos implicados en la respuesta glial exacerbada de los ratones FAAH^{-/-}.



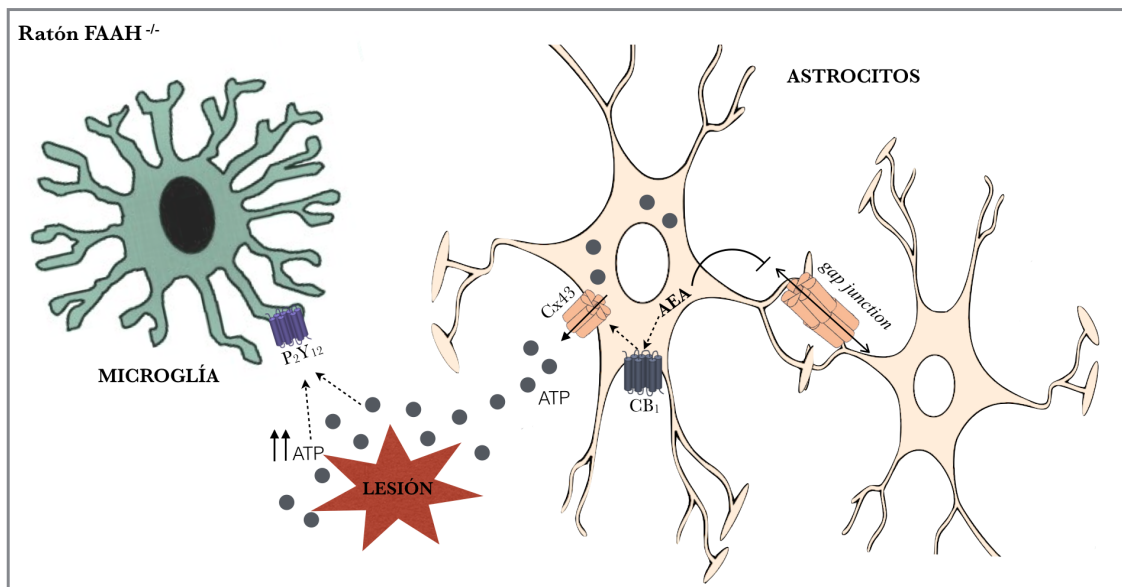


Figura 1. Esquema general de los principales mecanismos implicados en la respuesta microglial de un ratón $Cx3cr1^{+/GFP}/FAAH^{-/-}$ vs. WT. Tras provocar una ablación láser en el parénquima cerebral, se observa un aumento de ATP como consecuencia del daño celular, que va a ser responsable de iniciar la respuesta microglial observada. Además, también se produce liberación de ATP a través de los hemicanales astrocitarios Cx43, que en el caso de los ratones con la enzima FAHH inactivada se ve potenciada por la acción de la AEA, que ejerce su función a través de los receptores CB₁ y a su vez inhibe las *gap junctions*, favoreciendo aún más este intercambio de ATP con el medio extracelular. De acuerdo con la hipótesis que proponemos, el ATP actuaría por tanto como principal factor quimiotáctico con capacidad de atraer los procesos microgliales hacia el foco lesivo, a través de los receptores purinérgicos P₂Y₁₂ presentes en las células gliales (Burnstock & Kennedy, 1985; Dubyak & el-Moatassim, 1993).

Estudio *in vivo* de neuroinflamación crónica

La línea de ratón 5XFAD contiene cinco mutaciones relacionadas con el Alzheimer de tipo familiar y presenta una aparición muy temprana de placas amiloides y gliosis a los 2 meses de edad. Además, también presentan pérdida neuronal, pero no presentan hiperfosforilación de tau (Oakley et al., 2006). Según va envejeciendo el animal, los depósitos extracelulares aumentan en número y tamaño, y comienzan a extenderse por diversas áreas cerebrales, concentrándose más en las regiones de la corteza, hipocampo, subículo y tálamo. Este modelo transgénico también presenta activación astro- y micro-glial, y un aumento en los niveles de expresión de distintos marcadores de inflamación, ambas, características histopatológicas de la enfermedad (Akiyama et al., 2000). Al igual que en la EA, existe una alteración de la memoria, que en el caso de los ratones 5XFAD es apreciable a los 5-6 meses de edad, lo cual proporciona evidencias de que los agregados de A β juegan un papel fundamental en la neurodegeneración (Oakley et al., 2006).

Los resultados obtenidos en el MWM mostraron una alteración de la memoria en los ratones 5XFAD, apreciable a los 6 meses de edad, aunque no a los 3 meses. Esta ausencia de déficit cognitivo en animales de 3 meses de edad, ha sido descrita con anterioridad (Oakley et al., 2006; Jawhar et al., 2012) y pone de manifiesto que el daño cerebral comienza antes que la alteración de la memoria, hecho que podría ser relevante en la clínica a la hora de diagnosticar al paciente, ya que podría dificultar su diagnóstico, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad. De esta manera, determinamos la edad de estudio en 6 meses de edad. Y nos planteamos evaluar el papel de la enzima FAAH en los procesos de memoria y aprendizaje.

En un primer estudio, comprobamos que el deterioro cognitivo encontrado en los ratones de 6 meses de edad, no se veía modificado ni por la inactivación farmacológica de FAAH (mediante el tratamiento con URB597), ni por el bloqueo de los receptores CB₁. Sin embargo, los estudios realizados en el MWM con ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}, mostraron que la inactivación genética de FAAH producía una mejoría significativa en la memoria espacial y el aprendizaje. Estos resultados concuerdan con un estudio previo donde los autores observaron mediante el MWM, que los ratones FAAH^{-/-} presentaban tiempos de llegada a la plataforma menores y una evolución en el aprendizaje mayor, en comparación a los WT (Varvel et al., 2007). Esta discrepancia encontrada entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH, la habíamos observado previamente en el Diseño experimental I, y sugiere que aunque el URB597 sea un potente inhibidor irreversible de la FAAH, no es capaz de mimetizar la respuesta producida a través de la inhibición genética. Estos resultados apoyarían los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación (Benito et al., 2012). En este estudio, la delección genética de FAAH provocó en cultivos primarios de astrocitos tratados con A β , una respuesta inflamatoria exacerbada en comparación con los WT, que no pudo ser mimetizada a través de la inhibición farmacológica con URB597, sugiriendo que la ausencia de esta enzima produce diversos cambios en la función astrocitaria.

La razón para esta falta de efecto encontrada tras el tratamiento con URB597 no está clara, aunque nuestros resultados sugieren que es necesario incrementar los niveles de endocannabinoides de forma mantenida (en tiempo y/o magnitud), para desembocar en los efectos encontrados en este modelo de neuroinflamación crónica. De forma alternativa, puede que estos ratones FAAH^{-/-} hayan sufrido, como respuesta a la inhibición genética, una adaptación evolutiva que no se puede lograr a través de la inhibición farmacológica.

Además, descartamos que la mejora del aprendizaje y la memoria, inducida por la inactivación de FAAH, estuviese asociada a cambios emocionales o en la actividad motora. Es sabido que un efecto ansiolítico mejoraría significativamente el tiempo de latencia en el MWM (Fernández-Teruel et al., 1991); en nuestro caso los animales FAAH^{-/-} no presentaron ningún cambio en la conducta en el EPM, aunque sí encontramos un efecto ansiolítico ligado a la enfermedad, que concuerda con datos previamente descritos en este modelo de ratón (Oakley et al., 2006; Jawhar et al., 2012). Añadir que respecto a posibles cambios en la actividad motora, tampoco hemos detectado ninguna alteración, tras el análisis de la velocidad y distancia de natación (no se muestran los datos).

Por otra parte, hemos podido comprobar que este efecto encontrado en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} es independiente de los receptores CB₁, tal y como muestran los resultados tras el tratamiento con el antagonista SR₁, lo que sugiere la participación de otros receptores. Tras el análisis mediante espectrometría de masas, pudimos corroborar que la inactivación de FAAH, tanto genética como farmacológica, induce en el cerebro un incremento en los niveles de sus principales sustratos: AEA, PEA y OEA (Cravatt & Lichtman, 2002; Fegley et al., 2005), mientras que los niveles de 2-AG (principal sustrato de MAGL) se mantienen inalterados. Tanto PEA como OEA son estructuralmente similares a la AEA, sin embargo no son capaces de activar a los receptores CB₁. Por el contrario, la anandamida sí es capaz de activar a los receptores CB₁, pero además presenta la capacidad de activar los receptores nucleares PPAR α (Sun et al., 2006), al igual que lo hacen OEA y PEA (Guzmán et al., 2004; Lo Verme et al., 2005). Podría ocurrir que el efecto observado se deba a la interacción de estos cannabinoides endógenos con los receptores PPAR α , que como ya habían observado en sus ensayos Mazzola y colaboradores (2009) y Panlilio y colaboradores (2013), están implicados en el control de la memoria. La implicación de estos receptores tendría sentido, debido a su abundante localización en el hipocampo (Moreno et al., 2004), así como por su participación en procesos inflamatorios (Combs et al., 2001) y en el metabolismo de la glucosa (Guerre-Millo et al., 2000). Próximos experimentos podrían aclarar si esta reducción del déficit de aprendizaje y memoria espacial, asociada al bloqueo de FAAH, podría involucrar a estos receptores.

Posteriormente se realizó una cuantificación de los depósitos extracelulares de A β fibrilar (teñidos con Tioflavina S), en las regiones más afectadas por la patología amiloidea como son la corteza y el hipocampo, y de forma sorprendente,

detectamos una disminución del número de placas en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}. Esta pérdida significativa de la carga amiloide también se vio reflejada tras la determinación de los niveles de los péptidos Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ por ELISA, donde encontramos disminuciones de más del 50% en ambos casos. Estos datos revelan por tanto una disminución del péptido Aβ, que se produce tanto en la fracción soluble, como en los depósitos fibrilares.

También se analizó la expresión de APP, BACE y PSN mediante *western-blot*, para comprobar si la delección de FAAH pudiera estar afectando a la funcionalidad de las mismas. Los resultados de este estudio mostraron en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-}, un descenso significativo en los niveles de expresión de APP. Estos hallazgos revelan por primera vez en un estudio *in vivo* de neuroinflamación crónica, que el incremento del tono endocannabinoide, a través de la inhibición de FAAH, produce importantes alteraciones en el procesamiento y producción del péptido amiloide, que se ven reflejadas en 1) una reducción de los depósitos extracelulares de Aβ; 2) un descenso en los niveles de Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂; y 3) una reducción de la proteína APP, sugiriendo así una vez más el posible potencial terapéutico de la modulación de la enzima FAAH.

Con el fin de comprobar si estas alteraciones en el procesamiento del péptido Aβ observadas en los ratones 5XFAD/FAAH^{-/-} iban acompañadas de una menor gliosis, se realizó un estudio inmunohistoquímico para analizar la micro- y astrogliosis en el cerebro de estos ratones. Los resultados de este estudio revelaron en los ratones 5XFAD, una clara activación micro y astro-glial, que se hizo más evidente en las áreas con depósitos de placas, indicativa de un fenotipo activado asociado con la inflamación. Tras el análisis de los cortes de tejido procedentes de ratones con la enzima FAAH inactivada (5XFAD/FAAH^{-/-}), detectamos que estos presentaban una disminución significativa en la medida de la intensidad de ambos marcajes (Iba1 y GFAP) en comparación con los ratones 5XFAD. También realizamos el mismo estudio tras los tratamientos con SR1 y URB597, sin encontrar diferencias en ninguno de los parámetros medidos.

Estos resultados inmunohistoquímicos, mostraron un perfil proinflamatorio en los ratones 5XFAD, característico de la enfermedad, donde vemos que se produce una sobreactivación celular, que como ya sabemos, juega un papel crítico en el proceso neurodegenerativo (Wyss-Coray & Mucke, 2002). En el caso de los ratones con la enzima FAAH inactivada (5XFAD/FAAH^{-/-}), el descenso en la micro- y astrogliosis estaría asociado con el descenso encontrado en la deposición de Aβ extracelular que anteriormente comentábamos.

En vista a estos resultados, y dado que la microglía asociada a las placas posee un papel fundamental en cuanto a la eliminación del A β extracelular, debido a su capacidad fagocítica (Bolmont et al., 2008), decidimos analizar este aspecto empleando los mismos animales, a través del marcaje con CD68 ampliamente usado como marcador de células microgliales activadas (Matsumura et al., 2015). Los resultados de este estudio cuantitativo de activación microglial revelaron que, al contrario de la disminución observada en el número total de células microgliales, en los niveles de microglía activada apenas existían diferencias entre los animales 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}, es decir, en los ratones 5XFAD no toda la microglía estaba activada y en los ratones con la enzima FAAH inactivada prácticamente toda la microglía sí está activada. Esto podría explicar, al menos en parte, las alteraciones encontradas en el péptido amiloide en este modelo animal con la enzima FAAH inactivada. Y por lo tanto, podríamos especular que en estos ratones se induce un cambio de fenotipo en la microglía, que podría contribuir de forma beneficiosa frenando la formación de placas y así la progresión de la enfermedad.

Posteriormente decidimos analizar los parámetros inflamatorios mediante estudios de ARNm y proteínas. Los resultados obtenidos por PCR cuantitativa mostraron una vez más el perfil proinflamatorio de los animales 5XFAD que ya se venía demostrando en otros estudios con el mismo modelo animal, pero además observamos que el bloqueo de los receptores CB₁ inducía un marcado incremento en los niveles de ARNm de las citoquinas IL1 β , IL6 y TNF α . Estos resultados podrían sugerir que CB₁ tiene un papel antiinflamatorio, que resulta bloqueado tras el tratamiento con SR1, como ya venían apoyando previamente otro grupos de investigación en diferentes estudios (Molina-Holgado et al., 2003; Ortega-Gutiérrez et al., 2005; Marchalant et al., 2007). Por otra parte y paradójicamente, los animales 5XFAD/FAAH^{-/-} presentaron un incremento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias (IL1 β , IL6 y TNF α) en comparación con los 5XFAD, lo cual puede resultar contradictorio teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el MWM y en el análisis inmunohistoquímico. Este perfil proinflamatorio debido a la inactivación genética o farmacológica de FAAH, ya ha sido señalado por otros autores, tanto en estudios *in vitro* realizados con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Benito et al., 2012), como *in vivo* (Mukhopadhyay et al., 2011; Atvie et al., 2015). Asimismo el bloqueo de los receptores CB₁ en estos ratones, consiguió revertir este incremento de los parámetros inflamatorios, en concordancia con anteriores estudios (Mukhopadhyay et al., 2011; Rajesh et al., 2012), por lo que dentro del contexto de la patología amiloide podemos ver un papel dual para el receptor CB₁,

dependiendo de los niveles de AEA y otras NAEs, puesto que por un lado su bloqueo media la disminución de la producción de sustancias proinflamatorias (5XFAD/FAAH^{-/-}) y por otro desencadena el aumento de la respuesta inflamatoria (5XFAD). Serán necesarios experimentos adicionales para poder clarificar la compleja interacción entre el SEC y el proceso neuroinflamatorio.

Por otra parte, los resultados obtenidos del estudio de proteínas de las citoquinas IL-6 e IL-1 β mediante ELISA, muestran discrepancias entre los niveles de ARNm y proteínas, ya que nuestros resultados revelaron únicamente un aumento en los niveles de proteína de IL-1 β como consecuencia de la patología amiloide, pero no respecto al genotipo de FAAH (5XFAD vs. 5XFAD/FAAH^{-/-}). Estas discrepancias ponen de manifiesto que los niveles de ARNm no necesariamente se correlacionan con los niveles de expresión de proteínas, y que por tanto no son suficientes para confirmar la expresión de la proteína madura correspondiente, lo cual podría explicarse por los mecanismos de regulación post-transcripcionales.

Es importante mencionar que debido a la disminución de placas y gliosis que acompaña a estos ratones con la enzima FAAH inactiva, cabría esperar una disminución en el nivel de esta citoquina, sin embargo, vemos que no fue el caso y los niveles de proteína de IL-1 β alcanzaron niveles similares a los observados en el grupo 5XFAD. Esta equivalencia entre ambos grupos sí la hemos observado tras el estudio cuantitativo de activación microglial con el marcador CD68, sugiriendo una exacerbada activación microglial que podría explicar los altos niveles de IL-1 β (Ativie et al., 2015).

Actualmente la opinión más aceptada es que la generación continuada de citoquinas proinflamatorias, y específicamente de IL-1 β , agrava el cuadro inflamatorio y aumenta el daño neuronal, con el consiguiente impacto negativo en la EA (Mrak & Griffin, 2001; McAfoose & Baune, 2009). Sin embargo, existen opiniones controvertidas en relación al papel de esta interleuquina, ya que algunos autores le atribuyen efectos neuroprotectores (Rothwell & Luheshi, 2000; Herx et al., 2000; Arnett et al., 2003). En un estudio reciente, Ghosh y colaboradores (2013) demostraron en el ratón triple transgénico (3xTgAD), el cual desarrolla las patologías A β y Tau, que la sobreexpresión de IL-1 β de forma restringida en el hipocampo, estaba asociada con un incremento de la fagocitosis de A β extracelular, que se debía a un aumento en el número de células de microglía asociadas a placas. Estos resultados sugieren que IL-1 β podría tener un papel beneficioso en esta patología, como ya habían descrito antes otros autores (Shafteel et al., 2007; Matousek et al., 2012).

Esta aparente contradicción, en la que se le atribuyen propiedades neuroprotectoras a la sobreexpresión de IL-1 β , ha sido señalada también por Matousek y colaboradores (2012), quienes describieron en el modelo de ratón doble transgénico (APP/PS1) que tras la sobreexpresión prolongada de esta interleuquina en el hipocampo, detectaban una disminución en el número de placas neuríticas. Este hecho podría explicar la discrepancia encontrada entre la inactivación farmacológica y genética de FAAH.

Si bien, el aumento en los niveles de IL-1 β en los ratones FAAH^{-/-} permanece aún sin clarificarse, podemos sugerir alguna hipótesis. Podríamos especular que la producción exacerbada de IL-1 β podría ser consecuencia de una pérdida de función de los receptores TRPV1, los cuales juegan un papel relevante en la respuesta inflamatoria (Davis et al., 2000; Ma & Quirion, 2007). Varios estudios realizados con ratones TRPV1 *knockout*, han demostrado que el bloqueo de los receptores TRPV1 produce un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, promoviendo una respuesta inflamatoria exacerbada (Wang & Wang, 2009; Huang et al., 2015). El cannabinoide endógeno AEA se comporta como un agonista de este receptor (Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 1999; Ross, 2003; Miyanohara et al., 2015); sin embargo, una exposición prolongada a este agonista vanilloide, podría producir la desensibilización de este receptor (Di Marzo et al., 2001; Toth et al., 2005; Lizanecz et al., 2006), y en consecuencia producir un estado de desfuncionalización, que podría inducir un aumento en los niveles de IL-1 β .

En resumen, los resultados del presente trabajo en un modelo *in vivo* de EA, ponen de manifiesto que la inactivación de FAAH induce múltiples efectos en la patología amiloide, entre los que se incluyen: la disminución de los niveles de A β soluble y de placas neuríticas, y la inducción de un fenotipo proinflamatorio, que paradójicamente tiene efectos beneficiosos que provocan la activación de la microglía asociada a placas, incrementando de esta forma su capacidad fagocítica. Estos y otros acontecimientos aparecen en la siguiente tabla a modo de resumen (Tabla 1).

Actualmente, no existen estudios que asocien la implicación de los endocannabinoides con el procesamiento de la APP. Sin embargo, resulta interesante que tanto la generación de A β (Cordy et al., 2006; Araki & Tamaoka, 2015) como el procesamiento y síntesis de algunos endocannabinoides (McFarland & Barker, 2005) están íntimamente ligados a los dominios lipídicos, también conocidos como *lipid rafts*. Por tanto su estudio podría ser relevante para encontrar la relación entre los endocannabinoides y el procesamiento de la APP.

	5XFAD	5XFAD/FAAH ^{-/-}
Niveles de endocannabinoides	= (wt)	↑(wt) AEA, PEA y OEA
Déficit cognitivo	↓(wt) memoria espacial y aprendizaje	↑(5XFAD) memoria espacial y aprendizaje
Patología amiloide	↑(5XFAD/FAAH ^{-/-}) Aβ ₁₋₄₀ y Aβ ₁₋₄₂ ↑(5XFAD/FAAH ^{-/-}) placas de amiloide ↑(5XFAD/FAAH ^{-/-}) APP	↓(5XFAD) Aβ ₁₋₄₀ y Aβ ₁₋₄₂ ↓(5XFAD) placas de amiloide ↓(5XFAD) APP
Gliosis	↑(5XFAD/FAAH ^{-/-}) micro y astro-gliosis	↓(5XFAD) micro y astro-gliosis
Activación microglial	↓(5XFAD/FAAH ^{-/-}) porcentaje de microglía activada	↑(5XFAD) porcentaje de microglía activada
Parámetros inflamatorios	↑(wt) citoquinas proinflamatorias	↑(5XFAD) citoquinas proinflamatorias
Niveles de proteína (IL-1β)	= (5XFAD/FAAH ^{-/-})	= (5XFAD)
Papel de receptores CB1	antiinflamatorio	proinflamatorio

Tabla 1. Resumen comparativo entre el genotipo FAAH^{+/+} y FAAH^{-/-} en el modelo 5XFAD a los 6 meses de edad. El incremento del tono endocannabinoide, a través de la inhibición de FAAH, produce importantes alteraciones en la patología amiloide, sugiriendo una vez más el posible potencial terapéutico de la modulación de esta enzima. Los niveles de micro- y astro-gliosis se ven reducidos en los ratones FAAH^{-/-} y sin embargo, el nivel de microglía activada se mantiene similar entre ambos fenotipos, indicando un fenotipo con mayor actividad fagocítica que conlleva la disminución de los depósitos extracelulares de Aβ y que contribuye de forma fundamental a disminuir el daño neurodegenerativo. Las flechas indican un incremento (↑) o una disminución (↓) respecto al grupo que se indica en paréntesis. = no se observan cambios significativos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado las consecuencias de la inactivación de FAAH en un contexto neuroinflamatorio. Para ello hemos evaluado el papel de FAAH en un modelo *in vivo* de neuroinflamación crónica y en un modelo *in vivo* de daño agudo.

Los resultados obtenidos en el diseño experimental I nos permiten concluir que:

1. El incremento del tono endocannabinoide, a través de la inhibición genética de FAAH, induce un aumento de la respuesta microglial frente a un estímulo lesivo en el parénquima cerebral, limitando así la propagación del mismo. Y además, produce un aumento de la actividad hemicanal astrocitaria.
2. Nuestros datos sugieren que únicamente los receptores CB₁ parecen participar en esta respuesta exacerbada y descartan la participación de los receptores CB₂.
3. La aplicación exógena de AEA está implicada en regular la apertura de los hemicanales astrocitarios Cx43, y sin embargo no modifica la respuesta microglial, lo que parece indicar que es necesario potenciar el tono endocannabinoide de forma prolongada o crónica para lograr ambas respuestas.
4. Los resultados de este estudio sugieren que el incremento de la actividad hemicanal basal en los ratones FAAH^{-/-}, podría explicar al menos en parte el aumento de la respuesta microglial observada en estos ratones con respecto a los WT.
5. Existe una discrepancia entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH, lo que sugiere que los ratones FAAH^{-/-} han sufrido, como respuesta a la inhibición genética, una adaptación evolutiva que no hemos podido mimetizar a través de la inhibición farmacológica.

Los resultados obtenidos en el diseño experimental II nos permiten concluir que:

1. El incremento del tono endocannabinoide, a través de la inhibición genética de FAAH, produce importantes alteraciones en el procesamiento y producción del péptido amiloide, lo cual pone de manifiesto que la modulación del SEC podría proporcionar beneficio terapéutico en patologías como la EA. Estas alteraciones se ven reflejadas en: 1) una reducción de los

- depósitos extracelulares de A β ; 2) descensos en los niveles de A β soluble; 3) una reducción de la proteína APP; 4) un descenso en la micro- y astro-gliosis, aunque la cantidad total de microglía activada es equivalente entre los animales 5XFAD y 5XFAD/FAAH^{-/-}; y 5) un aumento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias, específicamente de IL1 β .
2. La inactivación genética de FAAH produce una mejoría significativa en la memoria espacial y el aprendizaje, que es independiente de los receptores CB₁, lo que sugiere la participación de otros receptores.
 3. El tratamiento con URB597 no es capaz de mimetizar la respuesta producida a través de la inhibición genética. Por lo tanto, nuestro estudio refleja una discrepancia entre la inhibición farmacológica y genética de FAAH
 4. Dentro del contexto de la patología amiloide, el receptor CB₁ muestra un papel dual dependiendo de los niveles de endocannabinoides, puesto que por un lado su bloqueo media la disminución de la expresión de sustancias proinflamatorias (5XFAD/FAAH^{-/-}), y por otro desencadena un aumento de la respuesta inflamatoria (5XFAD).

BIBLIOGRAFÍA

Abudara, V., Roux, L., Dallérac, G., Matias, I., Dulong, J., Mothet, J.P., Rouach, N., and Giaume, C. (2015). Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia* 63, 795–811.

Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 19, 1704–1706.

Aguado, T., Romero, E., Monory, K., Palazuelos, J., Sendtner, M., Marsicano, G., Lutz, B., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2007). The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23892–23898.

Ahmad, R., Goffin, K., Van den Stock, J., De Winter, F.-L., Cleeren, E., Bormans, G., Tournoy, J., Persoons, P., Van Laere, K., and Vandenbulcke, M. (2014). In vivo type 1 cannabinoid receptor availability in Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 242–250.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.

Akomolafe, A., Beiser, A., Meigs, J.B., Au, R., Green, R.C., Farrer, L.A., Wolf, P.A., and Seshadri, S. (2006). Diabetes mellitus and risk of developing Alzheimer disease: results from the Framingham Study. *Arch. Neurol.* 63, 1551–1555.

Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der hirnrinde. *Z. Psych. Gerich. Med.* 64: 146148. (English translation in *The early story of Alzheimer's disease*, 1–3, by Bick K. L., Amaducci L., Pepeu G., editors. Eds., 1987, Padova: Liviana Press.

Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Gesamte Neurol Psychiat* 1911; 4: 356-385.

Alzheimer's Association. Early-Onset Dementia: A National Challenge, a Future Crisis. Washington, D.C.: Alzheimer's Association; 2006. Disponible en: https://www.alz.org/national/documents/report_earlyonset_full.pdf

Alzheimer's Disease Education and Referral Center. Alzheimer's Disease Genetics: Fact Sheet. National Institutes of Health, Bethesda, Md.; June 2011. Publication 11-6424. Disponible en: http://adrc.ucsd.edu/Publications/AD_Genetics_FactSheet_2011.pdf

American Psychiatric Association. Practice guidelines for the Treatment of Alzheimer Disease and Other Dementias of Late Life. Disponible en: http://www.psych.org/psych_pract/treatg/pg/pg_dementia_3.cfm#c.

Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.

Antonell, A., Mansilla, A., Rami, L., Lladó, A., Iranzo, A., Olives, J., Balasa, M., Sánchez-Valle, R., and Molinuevo, J.L. (2014). Cerebrospinal fluid level of YKL-40 protein in preclinical and prodromal Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 42, 901–908.

Araki, W., and Tamaoka, A. (2015). Amyloid beta-protein and lipid rafts: focused on biogenesis and catabolism. *Front Biosci (Landmark Ed)* 20, 314–324.

Araque, A., and Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2375–2381.

Araque, A., Carmignoto, G., and Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 795–813.

Arends, Y.M., Duyckaerts, C., Rozemuller, J.M., Eikelenboom, P., and Hauw, J.J. (2000). Microglia, amyloid and dementia in alzheimer disease. A correlative study. *Neurobiol. Aging* 21, 39–47.

Arnett, H.A., Wang, Y., Matsushima, G.K., Suzuki, K., and Ting, J.P.-Y. (2003). Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration. *J. Neurosci.* 23, 9824–9832.

Ashton, J.C., Friberg, D., Darlington, C.L., and Smith, P.F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396, 113–116.

Ativie, F., Albayram, O., Bach, K., Pradier, B., Zimmer, A., and Bilkei-Gorzo, A. (2015). Enhanced microglial activity in FAAH(-/-) animals. *Life Sci.* 138, 52–56.

Atwood, B.K., and Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* 160, 467–479.

Azizi, G., and Mirshafiey, A. (2012). The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34, 881–895.

Bahr, B.A., Karanian, D.A., Makanji, S.S., and Makriyannis, A. (2006). Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 15, 351–365.

Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., and Hiley, C.R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 1–4.

Baumann, K., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336, 417–424.

Begg, M., Pacher, P., Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F.M., Liu, J., and Kunos, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* 106, 133–145.

Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213–227.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., and Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094–1097.

Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 105, 1–25.

Benito, C., Núñez, E., Tolón, R.M., Carrier, E.J., Rábano, A., Hillard, C.J., and Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* 23, 11136–11141.

Benito, C., Núñez, E., Pazos, M.R., Tolón, R.M., and Romero, J. (2007). The endocannabinoid system and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* *36*, 75–81.

Benito, C., Tolón, R.M., Pazos, M.R., Núñez, E., Castillo, A.I., and Romero, J. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* *153*, 277–285.

Benito, C., Tolón, R.M., Castillo, A.I., Ruiz-Valdepeñas, L., Martínez-Orgado, J.A., Fernández-Sánchez, F.J., Vázquez, C., Cravatt, B.F., and Romero, J. (2012). β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *Br. J. Pharmacol.* *166*, 1474–1489.

Bennett, M.V.L., Garré, J.M., Orellana, J.A., Bukauskas, F.F., Nedergaard, M., and Sáez, J.C. (2012). Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res.* *1487*, 3–15.

Benzi, G., and Moretti, A. (1995). Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* *16*, 661–674.

Bianca, V.D., Dusi, S., Bianchini, E., Dal Prà, I., and Rossi, F. (1999). beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *274*, 15493–15499.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., and Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *256*, 377–380.

Bloom, G.S. (2014). Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* *71*, 505–508.

Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Kohsaka, S., Jucker, M., and Calhoun, M.E. (2008). Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci.* *28*, 4283–4292.

Bondolfi, L., Calhoun, M., Ermini, F., Kuhn, H.G., Wiederhold, K.-H., Walker, L., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2002). Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* 22, 515–522.

Bonhaus, D.W., Chang, L.K., Kwan, J., and Martin, G.R. (1998). Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 884–888.

Bosier, B., Bellocchio, L., Metna-Laurent, M., Soria-Gomez, E., Matias, I., Herbert-Chatelain, E., Cannich, A., Maitre, M., Leste-Lasserre, T., Cardinal, P., et al. (2013). Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol Metab* 2, 393–404.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourri , B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* 312 (Pt 2), 637–641.

Bouaboula, M., Perrachon, S., Milligan, L., Canat, X., Rinaldi-Carmona, M., Portier, M., Barth, F., Calandra, B., Pecceu, F., Lupker, J., et al. (1997). A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 272, 22330–22339.

Bouaboula, M., Hilaiet, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G., and Casellas, P. (2005). Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 517, 174–181.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.

Brown, A.J. (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152, 567–575.

Brown, A.M., and Ransom, B.R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263–1271.

Brown, S.M., Wager-Miller, J., and Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 255–264.

Buckley, N.E. (2008). The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br. J. Pharmacol.* 153, 309–318.

Buckley, N.E., McCoy, K.L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C.C., Glass, M., and Zimmer, A. (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 396, 141–149.

Buczynski, M.W., and Parsons, L.H. (2010). Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. *Br. J. Pharmacol.* 160, 423–442.

Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433–440.

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., and Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* 16, 3934–3942.

Cajal SR (1913) Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol Univ. Madrid* 11: 255-315.

Cameron, B., and Landreth, G.E. (2010). Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 37, 503–509.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

Centonze, D., Battistini, L., and Maccarrone, M. (2008). The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2370–2342.

Chen, R., Zhang, J., Wu, Y., Wang, D., Feng, G., Tang, Y.-P., Teng, Z., and Chen, C. (2012). Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep* 2, 1329–1339.

Chever, O., Lee, C.-Y., and Rouach, N. (2014). Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 34, 11228–11232.

Childers, S.R., and Deadwyler, S.A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 52, 819–827.

Citraro, R., Russo, E., Scicchitano, F., van Rijn, C.M., Cosco, D., Avagliano, C., Russo, R., D'Agostino, G., Petrosino, S., Guida, F., et al. (2013). Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 69, 115–126.

Clinicaltrials.gov. (2016). Home - ClinicalTrials.gov. [online] Disponible en: <http://www.clinicaltrials.gov> [Accessed 18 May 2016].

Combs, C.K., Johnson, D.E., Karlo, J.C., Cannady, S.B., and Landreth, G.E. (2000). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J. Neurosci.* 20, 558–567.

Combs, C.K., Bates, P., Karlo, J.C., and Landreth, G.E. (2001). Regulation of beta-amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neurochem. Int.* 39, 449–457.

Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., and Giagnoni, G. (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 135, 181–187.

Contreras, J.E., Sánchez, H.A., Eugenín, E.A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V.L., and Sáez, J.C. (2002). Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 495–500.

Cordy, J.M., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol. Membr. Biol.* *23*, 111–122.

Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2005). The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem* *5*, 671–675.

Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Loría, F., Spagnolo, A., Docagne, F., Di Marzo, V., and Guaza, C. (2010). Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia* *58*, 135–147.

Craig-Schapiro, R., Perrin, R.J., Roe, C.M., Xiong, C., Carter, D., Cairns, N.J., Mintun, M.A., Peskind, E.R., Li, G., Galasko, D.R., et al. (2010). YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* *68*, 903–912.

Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2002). The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem. Phys. Lipids* *121*, 135–148.

Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J. Neurobiol.* *61*, 149–160.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., and Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* *384*, 83–87.

Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., and Lichtman, A.H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 9371–9376.

Cristiano, L., Bernardo, A., and Cerù, M.P. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J. Neurocytol.* *30*, 671–683.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415.

Croxford, J.L. (2003). Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs* 17, 179–202.

Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R., and Clark, J.B. (1998). Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J. Neurochem.* 70, 1366–1375.

Curb, J.D., Rodriguez, B.L., Abbott, R.D., Petrovitch, H., Ross, G.W., Masaki, K.H., Foley, D., Blanchette, P.L., Harris, T., Chen, R., et al. (1999). Longitudinal association of vascular and Alzheimer's dementias, diabetes, and glucose tolerance. *Neurology* 52, 971–975.

Danysz, W., Parsons, C.G., Mobius, H.J., Stoffler, A., and Quack, G. (2000). Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2, 85–97.

Darmani, N.A. (2001). Delta(9)-tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids prevent emesis produced by the cannabinoid CB(1) receptor antagonist/inverse agonist SR 141716A. *Neuropsychopharmacology* 24, 198–203.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183–187.

Del Río-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos I La microglia en estado normal II Intervención de la microglia en los procesos patológicos III Naturaleza probable de la microglia. *Bol de la Soc esp de biol* 9: 69–120, 1919.

Del Rio-Hortega P. Microglia. In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, edited by Penfield W. New York: Hoeber, 1932, p. 482–534.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* *34*, 605–613.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* *258*, 1946–1949.

Dickson, D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 321–339.

Dickson, T.C., and Vickers, J.C. (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* *105*, 99–107.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* *319*, 1086–1089.

Dou, Y., Wu, H., Li, H., Qin, S., Wang, Y., Li, J., Lou, H., Chen, Z., Li, X., Luo, Q., et al. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res.* *22*, 1022–1033.

Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Döring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Dorée, M., and Mandelkow, E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.* *11*, 2131–2138.

Dubyak, G.R., and el-Moatassim, C. (1993). Signal transduction via P2-puriner-gic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* *265*, C577–C606.

Eljaschewitsch, E., Witting, A., Mawrin, C., Lee, T., Schmidt, P.M., Wolf, S., Hoertnagl, H., Raine, C.S., Schneider-Stock, R., Nitsch, R., et al. (2006). The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* *49*, 67–79.

Erdozain, A.M., Meana, J.J., and Callado, L.F. (2009). Implicación del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo. *Trastornos Adictivos* 11, 85–95.

Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., and Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1272–1279.

Facchinetti, F., Del Giudice, E., Furegato, S., Passarotto, M., and Leon, A. (2003). Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. *Glia* 41, 161–168.

Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356.

Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., and Piomelli, D. (2005). Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 352–358.

Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., and Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 48, 443–450.

Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., et al. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393, 231–235.

Fernández-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., and Ramos, J.A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 66, 257–267.

Fernandez-Ruiz JJ, Gonzalez S, Romero J y Ramos JA (2005). Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection. In *Cannabinoids as Therapeutics*, Mechoulam R., ed., Birkhäuser Verlag/Switzerland, pp. 79-109.

Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Boix, F., and Tobena, A. (1991). Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol. Res.* 24, 273–282.

Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Lopez, O.L., Kawas, C.H., and Jagust, W. (2005). Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* 229-230, 43–49.

Fowler, C.J., Rojo, M.L., and Rodriguez-Gaztelumendi, A. (2010). Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? *Exp. Neurol.* 224, 37–47.

Frankhauser, M. 2002. "History of Cannabis in Western Medicine." In *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology and Therapeutic potential*, edited by F. Grotenhermen and R. Russo, 37-51. Binghampton, NY: Haworth.

Freitag, M.H., Peila, R., Masaki, K., Petrovitch, H., Ross, G.W., White, L.R., and Launer, L.J. (2006). Midlife pulse pressure and incidence of dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Stroke* 37, 33–37.

Froger, N., Orellana, J.A., Cohen-Salmon, M., Ezan, P., Amigou, E., Sáez, J.C., and Giaume, C. (2009). Cannabinoids prevent the opposite regulation of astroglial connexin43 hemichannels and gap junction channels induced by pro-inflammatory treatments. *J. Neurochem.* 111, 1383–1397.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Verme, J. Lo, Serrano, A., Rodríguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., et al. (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425, 90–93.

Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61.

Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* 86, 1646–1647.

Gatley, S.J., Gifford, A.N., Volkow, N.D., Lan, R., and Makriyannis, A. (1996). 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 331–338.

Gatley, S.J., Lan, R., Volkow, N.D., Pappas, N., King, P., Wong, C.T., Gifford, A.N., Pyatt, B., Dewey, S.L., and Makriyannis, A. (1998). Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *J. Neurochem.* 70, 417–423.

Gatz, M., Svedberg, P., Pedersen, N.L., Mortimer, J.A., Berg, S., and Johansson, B. (2001). Education and the risk of Alzheimer's disease: findings from the study of dementia in Swedish twins. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 56, P292–P300.

Ghosh, S., Wu, M.D., Shafte, S.S., Kyrkanides, S., LaFerla, F.M., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2013). Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J. Neurosci.* 33, 5053–5064.

Giaume, C., Leybaert, L., Naus, C.C., and Sáez, J.C. (2013). Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4, 88.

Giulian, D. (1999). Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 65, 13–18.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., et al. (2005). Anti-depressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18620–18625.

Godlewski, G., Alapafuja, S.O., Bátakai, S., Nikas, S.P., Cinar, R., Offertáler, L., Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Harvey-White, J., et al. (2010). Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects. *Chem. Biol.* *17*, 1256–1266.

Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* *1071*, 10–23.

Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., and Hipkin, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.* *57*, 1045–1050.

Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., et al. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* *156*, 15–20.

Gowran, A., Noonan, J., and Campbell, V.A. (2011). The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS Neurosci Ther* *17*, 637–644.

Graeber, M.B., Kösel, S., Egensperger, R., Banati, R.B., Müller, U., Bise, K., Hoff, P., Möller, H.J., Fujisawa, K., and Mehraein, P. (1997). Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* *1*, 73–80.

Griffin, G., Wray, E.J., Tao, Q., McAllister, S.D., Rorrer, W.K., Aung, M.M., Martin, B.R., and Abood, M.E. (1999). Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* *377*, 117–125.

Gross, S.S., and Wolin, M.S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* *57*, 737–769.

Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspé, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., Herbert, J.M., Winegar, D.A., Willson, T.M., Fruchart, J.C., et al. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J. Biol. Chem.* 275, 16638–16642.

Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520–528.

Guzmán, M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 3, 745–755.

Guzmán, M., Sánchez, C., and Galve-Roperh, I. (2001). Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med.* 78, 613–625.

Guzmán, M., Verme, J. Lo, Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., and Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J. Biol. Chem.* 279, 27849–27854.

Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.

Hachinski, V., and Munoz, D.G. (1997). Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease: cause, effect or epiphenomenon? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 1–6.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., and Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8268–8273.

Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P., and Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147, 58–62.

Hansen, H.S., Moesgaard, B., Hansen, H.H., and Petersen, G. (2000). N-Acylethanolamines and precursor phospholipids - relation to cell injury. *Chem. Phys. Lipids* 108, 135–150.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., and Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3662–3665.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002b). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Haycock, J.W., and Bro, S. (1975). Corpus striatum (Translation of S. Ramón y Cajal). translated from *Corps Strié*, chapter 23, in “Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés” 1911. *Behav Biol* 14, 387–402.

Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., and Julius, D. (2006). The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519.

Hebert, L.E., Scherr, P.A., McCann, J.J., Beckett, L.A., and Evans, D.A. (2001). Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *Am. J. Epidemiol.* 153, 132–136.

Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., and Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778–1783.

Heijer, T. den, Launer, L.J., Prins, N.D., van Dijk, E.J., Vermeer, S.E., Hofman, A., Koudstaal, P.J., and Breteler, M.M.B. (2005). Association between blood pressure, white matter lesions, and atrophy of the medial temporal lobe. *Neurology* 64, 263–267.

Heneka, M.T., and Landreth, G.E. (2007). PPARs in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1031–1045.

Heneka, M.T., Feinstein, D.L., Galea, E., Gleichmann, M., Wüllner, U., and Klockgether, T. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Neuroimmunol.* *100*, 156–168.

Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* *14*, 388–405.

Hensley, K. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J. Alzheimers Dis.* *21*, 1–14.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 1932–1936.

Hernangómez, M., Mestre, L., Correa, F.G., Loría, F., Mecha, M., Iñigo, P.M., Docagne, F., Williams, R.O., Borrell, J., and Guaza, C. (2012). CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation. *Glia* *60*, 1437–1450.

Herx, L.M., Rivest, S., and Yong, V.W. (2000). Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J. Immunol.* *165*, 2232–2239.

Hickman, S.E., Allison, E.K., and Khoury, J. El (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* *28*, 8354–8360.

Hines, D.J., Hines, R.M., Mulligan, S.J., and Macvicar, B.A. (2009). Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* *57*, 1610–1618.

Hoe, H.-S., and Rebeck, G.W. (2008). Functional interactions of APP with the apoE receptor family. *J. Neurochem.* *106*, 2263–2271.

Holtzman, D.M., Herz, J., and Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006312.

Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., and Kohsaka, S. (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* 21, 1975–1982.

Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Denning, T., Findlay, D., Holmes, C., et al. (2012). Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 366, 893–903.

Howlett, A.C. (1998). The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol. Dis.* 5, 405–416.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.

Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., et al. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8400–8405.

Huang, W.-X., Yu, F., Sanchez, R.M., Liu, Y.-Q., Min, J.-W., Hu, J.-J., Bsoul, N.B., Han, S., Yin, J., Liu, W.-H., et al. (2015). TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain. *Brain Behav. Immun.* 48, 68–77.

Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6436–6441.

Hyde, C., Peters, J., Bond, M., Rogers, G., Hoyle, M., Anderson, R., Jeffreys, M., Davis, S., Thokala, P., and Moxham, T. (2013). Evolution of the evidence on the effectiveness and cost-effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: systematic review and economic model. *Age Ageing* 42, 14–20.

Ignatowska-Jankowska, B.M., Ghosh, S., Crowe, M.S., Kinsey, S.G., Niphakis, M.J., Abdullah, R.A., Tao, Q., O' Neal, S.T., Walentiny, D.M., Wiley, J.L., et al. (2014). In vivo characterization of the highly selective monoacylglycerol lipase inhibitor KML29: antinociceptive activity without cannabimimetic side effects. *Br J Pharmacol* 171, 1392–1407.

Illes, P., and Ribeiro, J.A. (2004). Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr Top Med Chem* 4, 831–838.

Imbimbo, B.P., and Giardina, G.A.M. (2011). γ -secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem* 11, 1555–1570.

Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T.A., and Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 196.e29–e40.

Jiang, W., Zhang, Y., Xiao, L., Van Cleemput, J., Ji, S.-P., Bai, G., and Zhang, X. (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.* 115, 3104–3116.

Jiang, Z.J., Richardson, J.S., and Yu, P.H. (2008). The contribution of cerebral vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase to cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 194–204.

Johnson, G.V., and Hartigan, J.A. (1999). Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain: an update. *J. Alzheimers Dis.* 1, 329–351.

Jung, K.-M., Astarita, G., Yasar, S., Vasilevko, V., Cribbs, D.H., Head, E., Cotman, C.W., and Piomelli, D. (2012). An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 1522–1532.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106–4114.

Juszczak, G.R., and Swiergiel, A.H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 181–198.

Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., and Hol, E.M. (2012). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 60, 615–629.

Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28, 4702–4711.

Karpuk, N., Burkovetskaya, M., Fritz, T., Angle, A., and Kielian, T. (2011). Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity. *J. Neurosci.* 31, 414–425.

Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., et al. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* 9, 76–81.

Kawahara, H., Drew, G.M., Christie, M.J., and Vaughan, C.W. (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1214–1222.

Kielian, T., and Drew, P.D. (2003). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J. Neurosci. Res.* 71, 315–325.

Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* *81*, 302–313.

Klegeris, A., Walker, D.G., and McGeer, P.L. (1994). Activation of macrophages by Alzheimer beta amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 984–991.

Klein, T.W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 400–411.

Koenigsknecht-Talboo, J., Meyer-Luehmann, M., Parsadanian, M., Garcia-Alloza, M., Finn, M.B., Hyman, B.T., Bacsikai, B.J., and Holtzman, D.M. (2008). Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. *J. Neurosci.* *28*, 14156–14164.

Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J.L., Eom, G.D., Bernhardt, U., Miller, K.R., Prokop, S., Kettenmann, H., and Heppner, F.L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS ONE* *8*, e60921.

de Lago, E., Moreno-Martet, M., Cabranes, A., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J. (2012). Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology* *62*, 2299–2308.

Lambert, D.M., and Fowler, C.J. (2005). The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J. Med. Chem.* *48*, 5059–5087.

Landreth, G.E., and Heneka, M.T. (2001). Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *22*, 937–944.

Landreth, G.E., and Reed-Geaghan, E.G. (2009). Toll-like receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *336*, 137–153.

Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., and Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 2699–2704.

Launer, L.J., Andersen, K., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L.A., Brayne, C., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., et al. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. *European Studies of Dementia. Neurology* 52, 78–84.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151–170.

Lawson, L.J., Perry, V.H., and Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48, 405–415.

Lee, J.H., Agacinski, G., Williams, J.H., Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Francis, P.T., Wong, P.T.-H., Chen, C.P., and Lai, M.K.P. (2010). Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex. *Neurochem. Int.* 57, 985–989.

Li, X.-H., Xie, J.-Z., Jiang, X., Lv, B.-L., Cheng, X.-S., Du, L.-L., Zhang, J.-Y., Wang, J.-Z., and Zhou, X.-W. (2012). Methylglyoxal induces tau hyperphosphorylation via promoting AGEs formation. *Neuromolecular Med.* 14, 338–348.

Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A.J., Penke, B., Rube, C.E., Walter, J., Heneka, M.T., Hartmann, T., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* 188, 1098–1107.

Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H., and Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain* 128, 1778–1789.

Lizanecz, E., Bagi, Z., Pásztor, E.T., Papp, Z., Edes, I., Kedei, N., Blumberg, P.M., and Tóth, A. (2006). Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol. Pharmacol.* 69, 1015–1023.

Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavón, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., et al. (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* 5, 37–44.

López Rodríguez, A.B., Mateos Vicente, B., Romero-Zerbo, S.Y., Rodríguez-Rodríguez, N., Bellini, M.J., Rodríguez de Fonseca, F., Bermudez-Silva, F.J., Azcoitia, I., García-Segura, L.M., and Viveros, M.-P. (2011). Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb. Cortex* 21, 2046–2055.

Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., and Kwok, J.B.J. (2014). Genetics of dementia. *Lancet* 383, 828–840.

Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436–445.

Ma, W., and Quirion, R. (2007). Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 307–320.

Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 299–325.

Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J. Neuroendocrinol.* 20 Suppl 1, 10–14.

Mackie, K., and Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3825–3829.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., and Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552–6561.

MacKnight, C., Rockwood, K., Awalt, E., and McDowell, I. (2002). Diabetes mellitus and the risk of dementia, Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment in the Canadian Study of Health and Aging. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14, 77–83.

-
- Mailleux, P., and Vanderhaeghen, J.J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48, 655–668.
- Maldonado, R., Valverde, O., and Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 225–232.
- Manuel, I., González de San Román, E., Giralt, M.T., Ferrer, I., and Rodríguez-Puertas, R. (2014). Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer’s disease progression. *J. Alzheimers Dis.* 42, 761–766.
- Marchalant, Y., Rosi, S., and Wenk, G.L. (2007). Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience* 144, 1516–1522.
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B., and Behl, C. (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J. Neurochem.* 80, 448–456.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., et al. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84–88.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* 159, 379–387.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 7, 438–455.
- Di Marzo, V., and Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 8, 585–589.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., and Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686–691.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21, 521–528.

Di Marzo, V., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (2001). Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 346–349.

Masliah, E., Raber, J., Alford, M., Mallory, M., Mattson, M.P., Yang, D., Wong, D., and Mucke, L. (1998). Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 12548–12554.

Matousek, S.B., Ghosh, S., Shafte, S.S., Kyrkanides, S., Olschowka, J.A., and O'Banion, M.K. (2012). Chronic IL-1 β -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 156–164.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.

Matsumura, A., Suzuki, S., Iwahara, N., Hisahara, S., Kawamata, J., Suzuki, H., Yamauchi, A., Takata, K., Kitamura, Y., and Shimohama, S. (2015). Temporal changes of CD68 and α 7 nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. *J. Alzheimers Dis.* 44, 409–423.

Mattson, M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77, 1081–1132.

Mattson, M.P. (1998). Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 21, 53–57.

Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546–1549.

Mazzola, C., Medalie, J., Scherma, M., Panlilio, L.V., Solinas, M., Tanda, G., Drago, F., Cadet, J.L., Goldberg, S.R., and Yasar, S. (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn. Mem.* 16, 332–337.

-
- McAfoose, J., and Baune, B.T. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 355–366.
- McFarland, M.J., and Barker, E.L. (2005). Lipid rafts: a nexus for endocannabinoid signaling? *Life Sci.* 77, 1640–1650.
- McLarnon, J.G. (2012). Microglial chemotactic signaling factors in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis* 1, 199–204.
- Mechoulam, R., and Gaoni, Y. (1965). A total synthesis of delta-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3273–3275.
- Mechoulam, R., Shani, A., Edery, H., and Grunfeld, Y. (1970). Chemical basis of hashish activity. *Science* 169, 611–612.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., and Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Mechoulam, R., Spatz, M., and Shohami, E. (2002a). Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci. STKE* 2002, re5.
- Mechoulam, R., Panikashvili, D., and Shohami, E. (2002b). Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 8, 58–61.
- Michaud, J.-P., Hallé, M., Lampron, A., Thériault, P., Préfontaine, P., Filali, M., Tribout-Jover, P., Lanteigne, A.-M., Jodoin, R., Cluff, C., et al. (2013). Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1941–1946.
- Mielke, M.M., Leoutsakos, J.-M., Corcoran, C.D., Green, R.C., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Tschanz, J.T., and Lyketsos, C.G. (2012). Effects of Food and Drug Administration-approved medications for Alzheimer's disease on clinical progression. *Alzheimers Dement* 8, 180–187.

-
- Miyanohara, J., Shirakawa, H., Sanpei, K., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2015). A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *467*, 478–483.
- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J.D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R.M., and Rothwell, N.J. (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neurosci.* *23*, 6470–6474.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* *43*, 109–142.
- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., and Cerù, M.P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* *123*, 131–145.
- Moriconi, A., Cerbara, I., Maccarrone, M., and Topai, A. (2010). GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. *Curr. Med. Chem.* *17*, 1411–1429.
- Mosher, K.I., and Wyss-Coray, T. (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer’s disease. *Biochem. Pharmacol.* *88*, 594–604.
- Mounsey, R.B., Mustafa, S., Robinson, L., Ross, R.A., Riedel, G., Pertwee, R.G., and Teismann, P. (2015). Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson’s disease. *Exp. Neurol.* *273*, 36–44.
- Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* *22*, 903–908.
- Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Rajesh, M., Matsumoto, S., Saito, K., Bátkai, S., Patel, V., Tanchian, G., Gao, R.Y., Cravatt, B.F., et al. (2011). Fatty acid amide hydrolase is a key regulator of endocannabinoid-induced myocardial tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* *50*, 179–195.
- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* *365*, 61–65.

Nägga, K., Gottfries, J., Blennow, K., and Marcusson, J. (2002). Cerebrospinal fluid phospho-tau, total tau and beta-amyloid(1-42) in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14, 183–190.

Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883–893.

Navarrete, M., and Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113–126.

Nelson, P.T., Braak, H., and Markesbery, W.R. (2009). Neuropathology and Cognitive Impairment in Alzheimer Disease: A Complex but Coherent Relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 1–14.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R.M., and Romero, J. (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208–213.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* 26, 10129–10140.

Obara, M., Szeliga, M., and Albrecht, J. (2008). Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem. Int.* 52, 905–919.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1063–1070.

Onaivi, E.S., Sugiura, T., and Marzo, V.D. (2005). *Endocannabinoids: The Brain and Body's Marijuana and Beyond* (CRC Press).

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., et al. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1074*, 514–536.

Orellana, J.A., Sáez, P.J., Shoji, K.F., Schalper, K.A., Palacios-Prado, N., Velarde, V., Giaume, C., Bennett, M.V.L., and Sáez, J.C. (2009). Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 369–399.

Orellana, J.A., Figueroa, X.F., Sánchez, H.A., Contreras-Duarte, S., Velarde, V., and Sáez, J.C. (2011). Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS Neurol Disord Drug Targets* *10*, 404–414.

Orellana, J.A., Martinez, A.D., and Retamal, M.A. (2013). Gap junction channels and hemichannels in the CNS: regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* *75*, 567–582.

Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., Klooster, J., Bossers, K., and Hol, E.M. (2014). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiol. Aging* *35*, 1–14.

Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., and Guaza, C. (2005). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* *52*, 163–168.

O'Shaughnessy, W.B. (1843). On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah. *Prov Med J Retrospect Med Sci* *5*, 363–369.

Pacher, P., Bátkai, S., and Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* *58*, 389–462.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* *87*, 315–424.

Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* *20*, 2405–2407.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739–745.

Pamplona, F.A., Ferreira, J., Menezes de Lima, O., Duarte, F.S., Bento, A.F., Forner, S., Villarinho, J.G., Bellocchio, L., Bellochio, L., Wotjak, C.T., et al. (2012). Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 21134–21139.

Panlilio, L.V., Justinova, Z., and Goldberg, S.R. (2013). Inhibition of FAAH and activation of PPAR: new approaches to the treatment of cognitive dysfunction and drug addiction. *Pharmacol. Ther.* *138*, 84–102.

Pasinetti, G.M. (1998). Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J. Neurosci. Res.* *54*, 1–6.

Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., and Hillard, C.J. (2005). Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 1057–1069.

Peila, R., Rodriguez, B.L., Launer, L.J., and Honolulu-Asia Aging Study (2002). Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes* *51*, 1256–1262.

Pekny, M., and Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* *204*, 428–437.

Pertwee, R.G. (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* *76*, 1307–1324.

Pertwee, R.G., and Ross, R.A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *66*, 101–121.

Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P.H., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K., et al. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* 62, 588–631.

Perusini G. 1910 Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. In: *Histologische und histopathologische Arbeiten über die Gehirnrinde.* (eds. Nissl F, Alzheimer A) Jena, Fischer, Vol III; 1909:297-351.

Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S.Y., Goutopoulos, A., Xie, X.Q., and Makriyannis, A. (1999). Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5802–5807.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., and Rodríguez de Fonseca, F. (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218–224.

Porter, A.C., Sauer, J.-M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 1020–1024.

Power, M.C., Weuve, J., Gagne, J.J., McQueen, M.B., Viswanathan, A., and Blacker, D. (2011). The association between blood pressure and incident Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology* 22, 646–659.

Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M. (2015). World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International (ADI). Disponible en: <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.

Prokop, S., Miller, K.R., and Heppner, F.L. (2013). Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 126, 461–477.

Puffenbarger, R.A., Boothe, A.C., and Cabral, G.A. (2000). Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29, 58–69.

Raber, J., Huang, Y., and Ashford, J.W. (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol. Aging* 25, 641–650.

Rajesh, M., Bátkai, S., Kechrid, M., Mukhopadhyay, P., Lee, W.-S., Horváth, B., Holovac, E., Cinar, R., Liaudet, L., Mackie, K., et al. (2012). Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 61, 716–727.

Ramírez, B.G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., and de Ceballos, M.L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci.* 25, 1904–1913.

Ramirez, S.H., Haskó, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., Reichenbach, N., Krizbai, I., Mahadevan, A., Zhang, M., et al. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J. Neurosci.* 32, 4004–4016.

Rammsayer, T.H. (2006). Effects of pharmacologically induced changes in NMDA receptor activity on human timing and sensorimotor performance. *Brain Res. 1073-1074*, 407–416.

Ray, A., Zoidl, G., Weickert, S., Wahle, P., and Dermietzel, R. (2005). Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 21, 3277–3290.

Retamal, M.A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P.J., Sáez, J.C., and Giaume, C. (2007). Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J. Neurosci.* 27, 13781–13792.

Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., and Gage, F.H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.

Riedel, G., and Davies, S.N. (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol* 445–477.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., and Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* *350*, 240–244.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarraan, M., Bouaboula, M., Calandra, B., et al. (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *284*, 644–650.

Roch, J.M., Masliah, E., Roch-Levecq, A.C., Sundsmo, M.P., Otero, D.A., Veinbergs, I., and Saitoh, T. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 7450–7454.

Rock, E.M., Sticht, M.A., Duncan, M., Stott, C., and Parker, L.A. (2013). Evaluation of the potential of the phytocannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin (THCV), to produce CB1 receptor inverse agonism symptoms of nausea in rats. *Br. J. Pharmacol.* *170*, 671–678.

Rockwell, C.E., and Kaminski, N.E. (2004). A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *311*, 683–690.

Rockwell, C.E., Snider, N.T., Thompson, J.T., Vanden Heuvel, J.P., and Kaminski, N.E. (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol.* *70*, 101–111.

Rogers, J., and Lue, L.F. (2001). Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* *39*, 333–340.

Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S.D., and Civin, W.H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *9*, 339–349.

Ross, R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140, 790–801.

Ross, R.A., Brockie, H.C., Stevenson, L.A., Murphy, V.L., Templeton, F., Makriyannis, A., and Pertwee, R.G. (1999). Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* 126, 665–672.

Rossor, M.N., Fox, N.C., Freeborough, P.A., and Harvey, R.J. (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 5, 393–397.

Rothwell, N.J., and Luheshi, G.N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23, 618–625.

Russo, E.B. (2013). *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential* (Routledge).

Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1092–1101.

Ryu, J.K., Cho, T., Choi, H.B., Wang, Y.T., and McLarnon, J.G. (2009). Microglial VEGF receptor response is an integral chemotactic component in Alzheimer's disease pathology. *J. Neurosci.* 29, 3–13.

Sadleir, K.R., and Vassar, R. (2012). Cdk5 protein inhibition and A β 42 increase BACE1 protein level in primary neurons by a post-transcriptional mechanism: implications of CDK5 as a therapeutic target for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 7224–7235.

Sáez, J.C., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F., Retamal, M.A., and Bennett, M.V.L. (2003). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol. Scand.* 179, 9–22.

Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., and Aasly, J. (2008). Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 23, 1156–1162.

Sastre, M., Klockgether, T., and Heneka, M.T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 167–176.

Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., and Alberts, M.J. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467–1472.

Scemes, E., Spray, D.C., and Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of “hemi-channels.” *Pflugers Arch.* 457, 1207–1226.

Schalper, K.A., Sánchez, H.A., Lee, S.C., Altenberg, G.A., Nathanson, M.H., and Sáez, J.C. (2010). Connexin 43 hemichannels mediate the Ca²⁺ influx induced by extracellular alkalization. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 299, C1504–C1515.

Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9649–9653.

Schwartz, J.P., and Nishiyama, N. (1994). Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. *Brain Res. Bull.* 35, 403–407.

Seibert, K., Masferrer, J., Zhang, Y., Gregory, S., Olson, G., Hauser, S., Leahy, K., Perkins, W., and Isakson, P. (1995). Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl.* 46, 41–50.

Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.

Selkoe, D.J. (1997). Images in neuroscience. Alzheimer's disease: from genes to pathogenesis. *Am J Psychiatry* 154, 1198.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1.

Shaftel, S.S., Kyrkanides, S., Olschowka, J.A., Miller, J.H., Johnson, R.E., and O'Banion, M.K. (2007). Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* *117*, 1595–1604.

Shastri, A., Bonifati, D.M., and Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* *2013*, 342931.

Shen, M., and Thayer, S.A. (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol. Pharmacol.* *54*, 459–462.

Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S., and Thayer, S.A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* *16*, 4322–4334.

Shoemaker, J.L., Joseph, B.K., Ruckle, M.B., Mayeux, P.R., and Prather, P.L. (2005). The endocannabinoid noladin ether acts as a full agonist at human CB2 cannabinoid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 868–875.

Van Sickle, M.D., Oland, L.D., Ho, W., Hillard, C.J., Mackie, K., Davison, J.S., and Sharkey, K.A. (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology* *121*, 767–774.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* *310*, 329–332.

Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* *129*, 877–896.

Sinor, A.D., Irvin, S.M., and Greenberg, D.A. (2000). Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* *278*, 157–160.

Skaper, S.D., and Facci, L. (2012). Mast cell-glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *367*, 3312–3325.

Skoog, I., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L.A., Nilsson, L., Persson, G., Odén, A., and Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 347, 1141–1145.

Smart, D., Gunthorpe, M.J., Jerman, J.C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A.I., Chambers, J.K., Randall, A.D., and Davis, J.B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* 129, 227–230.

Smith, W.L., and Marnett, L.J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1083, 1–17.

Solas, M., Francis, P.T., Franco, R., and Ramirez, M.J. (2013). CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer’s disease patients. *Neurobiol. Aging* 34, 805–808.

Solito, E., and Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer’s disease. *Front Pharmacol* 3, 14.

Sosinsky, G.E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H.S., Laird, D.W., MacVicar, B., Naus, C.C., Penuela, S., Scemes, E., Spray, D.C., et al. (2011). Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5, 193–197.

Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48, 267–277.

Stella, N., Schweitzer, P., and Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773–778.

van der Stelt, M., Veldhuis, W.B., van Haften, G.W., Fezza, F., Bisogno, T., Bar, P.R., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F., Di Marzo, V., and Nicolay, K. (2001). Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J. Neurosci.* 21, 8765–8771.

Stelzmann, R.A., Norman Schnitzlein, H., and Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer’s 1907 paper, “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde.” *Clin. Anat.* 8, 429–431.

Stenkamp, R.E., Teller, D.C., and Palczewski, K. (2002). Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *Chembiochem* 3, 963–967.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 271, 1004–1010.

Strassburger, T.L., Lee, H.C., Daly, E.M., Szczepanik, J., Krasuski, J.S., Mentis, M.J., Salerno, J.A., DeCarli, C., Schapiro, M.B., and Alexander, G.E. (1997). Interactive effects of age and hypertension on volumes of brain structures. *Stroke* 28, 1410–1417.

Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 563–581.

Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1, 14.

Strohmeyer, R., Ramirez, M., Cole, G.J., Mueller, K., and Rogers, J. (2002). Association of factor H of the alternative pathway of complement with agrin and complement receptor 3 in the Alzheimer's disease brain. *J. Neuroimmunol.* 131, 135–146.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.

Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S., and Waku, K. (2002). Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 173–192.

Suh, S.W., Bergher, J.P., Anderson, C.M., Treadway, J.L., Fosgerau, K., and Swanson, R.A. (2007). Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 45–50.

Sullivan, J.M. (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn. Mem.* 7, 132–139.

Sun, Y., Alexander, S.P.H., Kendall, D.A., and Bennett, A.J. (2006). Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1095–1097.

Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K.T., Friedman, D.L., Kimmel, L.H., Bergeson, J., Manetti, G.J., Zimmermann, M., Tang, B., et al. (2003). Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* *289*, 2094–2103.

Suzumura, A. (2009). [Neurotoxicity by microglia: the mechanisms and potential therapeutic strategy]. *Fukuoka Igaku Zasshi* *100*, 243–247.

Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., and Herrmann, N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* *68*, 930–941.

Sylantsev, S., Jensen, T.P., Ross, R.A., and Rusakov, D.A. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 5193–5198.

Szallasi, A., Nilsson, S., Farkas-Szallasi, T., Blumberg, P.M., Hökfelt, T., and Lundberg, J.M. (1995). Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.* *703*, 175–183.

Szekely, C.A., Thorne, J.E., Zandi, P.P., Ek, M., Messias, E., Breitner, J.C.S., and Goodman, S.N. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology* *23*, 159–169.

Takahashi, R.H., Almeida, C.G., Kearney, P.F., Yu, F., Lin, M.T., Milner, T.A., and Gouras, G.K. (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J. Neurosci.* *24*, 3592–3599.

Taylor, R.C., and Dillin, A. (2011). Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.

Tchantchou, F., Tucker, L.B., Fu, A.H., Bluett, R.J., McCabe, J.T., Patel, S., and Zhang, Y. (2014). The fatty acid amide hydrolase inhibitor PF-3845 promotes neuronal survival, attenuates inflammation and improves functional recovery in mice with traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 85, 427–439.

Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.

Thompson, R.J., and Macvicar, B.A. (2008). Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2, 81–86.

Tóth, A., Wang, Y., Kedei, N., Tran, R., Pearce, L.V., Kang, S.-U., Jin, M.-K., Choi, H.-K., Lee, J., and Blumberg, P.M. (2005). Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci.* 76, 2921–2932.

Trullas, R. and Skolnick, P. (1993) Differences in fear motivated behaviours among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 111: 323-331.

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.

Twitchell, W., Brown, S., and Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43–50.

Valenti, M., Cottone, E., Martinez, R., De Pedro, N., Rubio, M., Viveros, M.P., Franzoni, M.F., Delgado, M.J., and Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J. Neurochem.* 95, 662–672.

Valverde, O., Karsak, M., and Zimmer, A. (2005). Analysis of the endocannabinoid system by using CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Handb Exp Pharmacol* 117–145.

Varvel, S.A., Wise, L.E., Niyuhire, F., Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2007). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology* 32, 1032–1041.

-
- Vassar, R., and Kandalepas, P.C. (2011). The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 3, 20.
- Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., and Guzmán, M. (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol. Neurobiol.* 36, 60–67.
- Veldhuis, W.B., van der Stelt, M., Wadman, M.W., van Zadelhoff, G., Maccarone, M., Fezza, F., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Bär, P.R., Nicolay, K., et al. (2003). Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J. Neurosci.* 23, 4127–4133.
- Venance, L., Piomelli, D., Glowinski, J., and Giaume, C. (1995). Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376, 590–594.
- Verderio, C., and Matteoli, M. (2001). ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J. Immunol.* 166, 6383–6391.
- Verme, J. Lo, Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., and Piomelli, D. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.* 67, 15–19.
- Viveros, M.P., Marco, E.M., and File, S.E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 331–342.
- Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848–858.
- Walf, A.A., and Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2, 322–328.
- Walker, J.M., and Huang, S.M. (2002). Cannabinoid analgesia. *Pharmacol. Ther.* 95, 127–135.

Walter, L., and Stella, N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* *141*, 775–785.

Wang, Y., and Wang, D.H. (2009). Aggravated renal inflammatory responses in TRPV1 gene knockout mice subjected to DOCA-salt hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *297*, F1550–F1559.

WHO. World Health Organization and Alzheimer's Disease International. Dementia: a public health priority. Geneva: World Health Organization; 2012. Disponible en: http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/.

Wilson, R.I., Kunos, G., and Nicoll, R.A. (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* *31*, 453–462.

World Population Ageing (2009). New York, NY, United Nations, 2009. Available at: http://www.un.org/esa/population/publications/WPA2009/WPA2009_WorkingPaper.pdf

Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* *12*, 1005–1015.

Wyss-Coray, T., and Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* *35*, 419–432.

Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* *382*, 685–691.

Yang, L.-B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.-L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., et al. (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* *9*, 3–4.

Yao, D., and Brownlee, M. (2010). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* *59*, 249–255.

Zheng, W.-H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., and Kar, S. (2002). Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115, 201–211.

Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R., and Graier, W.F. (2003). Anandamide initiates Ca^{2+} signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 140, 1351–1362.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.

Zygmunt, P.M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D.A., Simonsen, C., Jönsson, B.A.G., Blomgren, A., Birnir, B., Bevan, S., Eschaliér, A., et al. (2013). Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* 8.

Publicaciones derivadas de la Tesis

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de dos artículos en revistas indexadas en la base de datos *Journal Citation Report* (JCR).

El manuscrito “**Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: In vivo studies**” ha sido publicado en *Neurobiology of Disease* con un factor de impacto de 5.078

El manuscrito “**Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation**” ha sido publicado en *Neurobiology of Aging* con un factor de impacto de 5.013

ANEXO



Endocannabinoids regulate the activity of astrocytic hemichannels and the microglial response against an injury: *In vivo* studies



Carmen Vázquez^a, Rosa María Tolón^a, María Ruth Pazos^{a,b}, Marta Moreno^a, Erin C. Koester^c, Benjamin F. Cravatt^d, Cecilia J. Hillard^c, Julián Romero^{a,e,*}

^a Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, 28922 Alcorcón, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

^c Neuroscience Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI 53226, USA

^d The Skaggs Institute for Chemical Biology and Department of Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, 92037, USA

^e School of Biosciences, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2014

Revised 2 April 2015

Accepted 19 April 2015

Available online 24 April 2015

Keywords:

Endocannabinoids

Astrocytes

Microglia

Hemichannels

Neuroprotection

Multiphoton microscopy

ABSTRACT

Anandamide (AEA) is an endocannabinoid (EC) that modulates multiple functions in the CNS and that is released in areas of injury, exerting putative neuroprotective actions. In the present study, we have used intravital microscopy to analyze the role of the EC system in the glial response against an acute insult. Our data show that AEA modulates astroglial function *in vivo* by increasing connexin-43 hemichannel (HC) activity. Furthermore, the genetic inactivation of the AEA-degrading enzyme, fatty acid amide hydrolase (FAAH), also increased HC activity and enhanced the microglial response against an acute injury to the brain parenchyma, effects that were mediated by cannabinoid CB₁ receptors. The contribution of ATP released through an astrocytic HC was critical for the microglial response, as this was prevented by the use of the HC blocker flufenamic acid and by apyrase. As could be expected, brain concentrations of AEA, palmitoylethanolamide (PEA) and oleoylethanolamide (OEA) were elevated in FAAH-null mice, while 2-arachidonoylglycerol (2-AG) concentrations remained unaltered. In summary, these findings demonstrate that AEA modifies glial functions by promoting an enhanced pro-inflammatory glial response in the brain.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Recent reports suggest that the endocannabinoid system (ECS) may play significant neuroprotective roles in different models of brain damage. These effects seem to be mediated mainly by cannabinoid CB₁ receptors,

located presynaptically in neuronal terminals. CB₁ receptors decrease the release of several neurotransmitters, including glutamate, thus dampening excitotoxicity. In addition, CB₁ receptors are also known to modify neuronal excitability by decreasing [Ca²⁺]_i and increasing K⁺ conductances (see Fernandez-Ruiz et al., 2005; Fowler et al., 2010 for reviews).

Shen et al. (1996) demonstrated that CB₁ agonists were able to protect rat hippocampal neurons in primary culture from several types of excitotoxic insult, while Nagayama et al. (1999) showed an *in vivo* CB₁-mediated neuroprotective effect after global transitory cerebral ischemia. Further experiments performed in rats and mice showed a release of the two main endocannabinoids, anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) after brain injury, although with subtle differences among animal species and experimental conditions (Panikashvili et al., 2001). These studies revealed that both AEA and 2-AG may exert a neuroprotective effect in which neuronal CB₁ receptors played a crucial role (Marsicano et al., 2003).

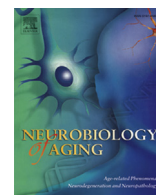
Less is known about the role of the ECS in glial cell function under normal and pathological conditions (see Pazos et al., 2005, for review). For instance, the precise roles that cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors play in astrocytic and microglial functions are still controversial. CB₁ receptors seem to be constitutively present in both types of cells and

Abbreviations: 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; AEA, arachidonylethanolamide, anandamide; ATP, adenosine triphosphate; CCL-2, chemokine (C-C motif) ligand-2; COX-2, cyclooxygenase-2; CX43, connexin-43; ECS, endocannabinoid system; EtBr, ethidium bromide; FAAH, fatty acid amide hydrolase; FFA, flufenamic acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HC, hemichannel; IL-1β, interleukin 1-beta; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NAEs, N-acylethanolamines; NFκB, nuclear factor kappa-B; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OEA, oleoylethanolamide; PEA, palmitoylethanolamide; SR1, SR141716A (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride); SR2, SR144529 (5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-[(4-methylphenyl)methyl]-N-[(1S, 2S, 4R)-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamide); URB597, (3'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-cyclohexylcarbamate.

* Corresponding author at: Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, C/ Budapest 1, 28922, Alcorcón, Madrid, Spain. Fax: +34 91 6219845.

E-mail addresses: jromerop@fhacorcon.es, j.romero.prof@ufv.es (J. Romero).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).



Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation



Carmen Vázquez^a, Rosa M. Tolón^a, M. Teresa Grande^b, Marina Caraza^{a,b},
Marta Moreno^a, Erin C. Koester^c, Borja Villaescusa^a, Lourdes Ruiz-Valdepeñas^a,
Francisco Javier Fernández-Sánchez^a, Benjamin F. Cravatt^{d,e,f}, Cecilia J. Hillard^c,
Julián Romero^{a,b,*}

^a Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Madrid, Spain

^b School of Biosciences, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^c Department of Pharmacology and Neuroscience Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

^d The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

^e Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

^f Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2014

Received in revised form 20 July 2015

Accepted 4 August 2015

Available online 15 August 2015

Keywords:

Endocannabinoid

Amyloid

Inflammation

Glia

ABSTRACT

The modulation of endocannabinoid (EC) levels and the activation of cannabinoid receptors are seen as promising therapeutic strategies in a variety of diseases, including Alzheimer's disease (AD). We aimed to evaluate the effect of the pharmacologic and genetic inhibition of anandamide-degrading enzyme in a mouse model of AD (5xFAD). Pharmacologic inhibition of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) had little impact on the expression of key enzymes and cytokines and also on the cognitive impairment, plaque deposition, and gliosis in 5xFAD mice. CB₁ blockade exacerbated inflammation in this transgenic mouse model of AD. The genetic inactivation of FAAH led to increases in the expression of inflammatory cytokines. At the same time, FAAH-null 5xFAD mice exhibited a behavioral improvement in spatial memory that was independent of the level of anxiety and was not CB₁ mediated. Finally, mice lacking FAAH showed diminished soluble amyloid levels, neuritic plaques, and gliosis. These data reinforce the notion of a role for the EC system in neuroinflammation and open new perspectives on the relevance of modulating EC levels in the inflamed brain.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Neuroinflammation is a key feature shared by many neurodegenerative conditions, including Alzheimer's disease (AD). The neuroinflammatory reaction in this disease is thought to be provoked mainly by the deposition of the amyloid-beta (Aβ) peptide in the form of neuritic plaques in the brain parenchyma which, together with the formation of neurofibrillary tangles of tau protein, constitutes the neuropathologic hallmarks of AD (Wyss-Coray, 2006; Querfurth and LaFerla, 2010).

The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases is still controversial (for recent reviews, see Cameron and Landreth, 2010; Wyss-Coray and Rogers, 2012). The predominant view indicates that inflammatory cytokines are released, mostly from glial cells, as a consequence of amyloid deposition and neuronal death, leading to a toxic milieu that aggravates the progression of

the disease (Mrak and Griffin, 2005). However, recent data support the notion of potentially beneficial effects of some cytokines that could play neurotrophic roles and dampen the damaging effects of amyloid accumulation (Shaftelet et al., 2008).

The endocannabinoid (EC) system is generally viewed as a part of the neuroprotective endogenous mechanisms of the central nervous system and has been proposed as a target for the treatment of neuroinflammation (Chen et al., 2012, 2013; Gowran et al., 2011; Mackie, 2006). Specifically, CB₁ and CB₂ agonists have been shown to provide neuroprotection in vivo (in terms of prevention of behavioral impairment, microglial activation, cytokine expression, glycogen synthase kinase-3 activity, superoxide dismutase 1 and 2 expression, and tau hyperphosphorylation) and in vitro (microglial mitochondrial activity, morphology, and cytokine production) in the context of AD (Aso et al., 2012, 2013; Martín-Moreno et al., 2011, 2012; Ramírez et al., 2005). Similar non-receptor-mediated effects of cannabinoids have also been reported (for a review, see Iuvone et al., 2009).

In addition, increased EC levels are found after acute brain damage and seem to play a beneficial role against different types of insult, including trauma, ischemia, and direct excitotoxicity, among

* Corresponding author at: Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Madrid 28922, Spain. Tel.: +34 91 6219846; fax: +34 91 6219845.

E-mail address: jromerop@falconcon.es (J. Romero).